



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1551号
学位記番号	第320号
氏名	小玉 菜央
授与年月日	平成28年12月28日
学位論文の題名	ヒト iPS 細胞の腸管上皮細胞への分化誘導と薬物動態学的機能解析
論文審査担当者	主査： 青山 峰芳 副査： 松永 民秀，頭金 正博，湯浅 博昭

名古屋市立大学学位論文

ヒトiPS細胞の腸管上皮細胞への分化誘導と薬物動態学的機能解析

平成 28 年度 (2016年9月)

名古屋市立大学大学院薬学研究科 臨床薬学分野

小玉 菜央

一．本論文は2016 年 9 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 青山 峰芳 教授

副査 湯浅 博昭 教授

頭金 正博 教授

松永 民秀 教授

二．本論文は、学術情報誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

【基礎となる報文】

1. **Nao Kodama**, Takahiro Iwao, Tomoki Kabeya, Takashi Horikawa, Takuro Niwa, Yuki Kondo, Katsunori Nakamura, Tamihide Matsunaga (2016) Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase, DNA methyltransferase, and transforming growth factor- $\beta$  promotes differentiation of human induced pluripotent stem cells into enterocytes. *Drug Metab Pharmacokinet*, **31**: 193–200.
2. **Nao Kodama**, Takahiro Iwao, Takahiro Katano, Kinya Ohta, Hiroaki Yuasa, Tamihide Matsunaga (2016) Characteristic analysis of intestinal transport in enterocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Dispos* **44**: 1662–1667.

三．本論文の基礎となる研究は、松永民秀 教授の指導のもとに名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

## 略語一覧

2-ME	2-メルカプトエタノール
A-83-01	3- (6-メチル-2-ピリジニル) -N-フェニル-4--1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド (4-キノリニル)
ABC	ATP 結合カセット
AhR	芳香族炭化水素受容体
ALK	アクチビン受容体様キナーゼ
BCRP	乳がん抵抗性タンパク質
BIO	6-ブロモインディルビン-3'-オキシム
BMP	骨形成タンパク質
CAR	構成的活性化アンドロスタン受容体
Cdx	尾側タイプホメオボックス
CYP	シトクロムP450
DAPI	4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール
DAPT	N- [ (3、5-ジフルオロフェニル) アセチル] -L-アラニル-2-フェニルグリシン-1,1-ジメチルエチルエステル
DMEM/F12	DMEM/ハムF-12 培地
DMEM	ダルベッコ変法イーグル培地
DMSO	ジメチルスルホキシド
DNMT	DNAメチル化転移酵素
EGF	上皮成長因子
EGFR	上皮成長因子受容体
EMT	上皮間充織転換
ER	流出比率
ERK	細胞外シグナル制御キナーゼ
ES細胞	胚性幹細胞
$F_a$	吸収率
FBS	ウシ胎仔血清
FDA	食品医薬品局
FGF	線維芽細胞増殖因子
FITC	フルオレセインイソチオシアネート

GAPDH	グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素
HIEC	ヒト小腸上皮細胞
iPS細胞	細胞人工多能性幹細胞
JAK	ヤヌスキナーゼ
JNK	Jun-N末端キナーゼ
KSR	KnockOut™血清代替
L-Glu	L-グルタミン溶液
LGR5	ロイシンリッチ反復領域を有するG-タンパク質共役型レセプター
MAP	分裂促進因子活性化タンパク質
MAPK	分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ
MAPKK	分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼキナーゼ
Matrigel	マトリゲル™基底膜マトリックス (成長因子を減じたもの)
MEF	マウス胎仔線維芽細胞
MEM NEAA	最小必須培地用非必須アミノ酸
MHLW	厚生労働省
MRP	多剤耐性関連タンパク質
OATP	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	有機カチオントランスポーター
$P_{app}$	見かけの膜透過係数
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
PD98059	2-(2-アミノ-3-メトキシフェニル) 4H-1-ベンゾピラン-4-オン
PEG	ポリエチレングリコール
P-gp	P-糖タンパク質
PI3K	ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ
PXR	プレグナンX 受容体
RIF	リファンピシン
RPMI	ロズウェルパーク記念研究所
RT	逆転写
SLC	溶質輸送体
SLC15A1/PEPT1	溶質輸送体ファミリー15 メンバー1/ペプチドトランスポー

ター 1

STAT	シグナル伝達性転写因子
SULT	硫酸転移酵素
TEER	経上皮電気抵抗
TGF- $\beta$	形質転換増殖因子- $\beta$
UGT	ウリジンジリン酸-グルクロン酸転移酵素
UPLC/MS/MS	超高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計
VDR	ビタミンD受容体.
Y-27632	(+)-(R)-トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル) シクロ ヘキサンカルボキサミド二塩酸塩

## 目次

第一章 序論	1
第二章 ヒトiPS 細胞から腸細胞への分化	4
2.1 緒言	4
2.2 実験方法	7
2.2.1 試薬及び細胞	7
2.2.2 ヒトiPS 細胞の培養	7
2.2.3 ヒトiPS 細胞の腸管上皮細胞への分化	8
2.2.4 誘導剤処理	8
2.2.5 RNA 抽出及び逆転写 (RT) 反応	8
2.2.6 リアルタイム RT-PCR 解析	9
2.2.7 薬物代謝酵素活性測定	11
2.2.8 統計解析	11
2.3 結果	12
2.3.1 腸管上皮細胞への分化に対するMEK、DNMTおよびTGF- $\beta$ 阻害剤の効果	12
2.3.2 MEK Inhibitor II、ZebularineおよびGW788388 水和物の効果	14
2.3.3 薬物代謝酵素活性	14
2.3.4 CYP3A4のmRNA発現誘導と代謝酵素活性	15
2.4 考察	17
2.5 小括	21
第三章 ヒトiPS 細胞由来腸管上皮細胞を利用した薬物の消化管吸収に関する特性解析	22
3.1 緒言	22
3.2 実験方法	23
3.2.1 試薬及び細胞	23
3.2.2 ヒトiPS 細胞の培養	23
3.2.3 ヒトiPS 細胞の腸細胞への分化	24
3.2.4 取り込み試験	24
3.2.5 免疫蛍光染色	24
3.2.6 経上皮電気抵抗 (TEER) 値の測定	25

3.2.7	膜透過試験	25
3.2.8	見かけの膜透過係数の算出	26
3.2.9	統計解析	26
3.3	結果	27
3.3.1	ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞におけるPEPT1を介した輸送解析	27
3.3.2	ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞層の形態学的特性解析	28
3.3.3	ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞におけるBCRPを介した輸送解析	29
3.3.4	腸管上皮様細胞層での横断的な試験化合物透過試験	31
3.4	考察	33
3.5	小括	35
第四章 総括		36
謝辞		38
引用文献		40



## 第一章 序論

生体内における医薬品の効果を理解するためには、その有効成分である薬物の体内動態(吸収・分布・代謝・排泄)を正確に予測することが非常に重要である。薬物の吸収は投与経路によって様々であるが、小腸は経口投与された薬物のほとんどを吸収する部位として非常に重要な臓器である。小腸における吸収は大きく分けて受動拡散、促進受動拡散、能動輸送及び飲作用の4つに分類される。リポイドセオリーとpH-分配仮説による受動拡散を基本としているが、小腸吸収上皮細胞には医薬品の吸収・排泄に関わる薬物トランスポーターが数多く発現していることが知られている。例えば、管腔側には溶質輸送体ファミリー15メンバー1/ペプチドトランスポーター 1 (SLC15A1/PEPT1) を始めとする取り込みトランスポーターやP糖タンパク質 (P-gp) や乳がん抵抗性タンパク質 (BCRP) などの排泄トランスポーターが、基底膜側には多剤耐性関連タンパク質3 (MRP3) や有機カチオントランスポーター (OCT) などが発現している。また、小腸吸収上皮細胞にはシトクロムP450 (CYP) を始めとする各種薬物代謝酵素も発現していることが知られている。従って、これらの基質となる薬物は管腔内のpHだけでなく薬物トランスポーターによる取り込みや排泄、薬物代謝酵素による代謝の影響を受けることから、生体内への吸収率は単純拡散のみを考えた吸収率の値から大きく変動する (Choi et al., 2013; Li et al., 2013; Yoshida et al., 2013; Kostewicz et al., 2014)。

薬物の多くは何らかの薬物トランスポーターや薬物代謝酵素により輸送・代謝されるため、併用薬同士による阻害・誘導を含めた薬物間相互作用が医療現場において問題となっている。そのため創薬の段階では、P-gpやBCRPなどの特に重要な薬物トランスポーターとCYPについての評価を行うことが米国食品医薬品局 (FDA) のガイダンス (FDA (2012) Guidance for industry Drug interaction studies —study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. DRAFT GUIDANCE.) や厚生労働省 (MHLW) のガイドライン (最終案) (厚生労働省医薬食品局 (2014) 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (最終案)) にも記載されている。

現在、消化管上皮の物質透過・吸収試験にはCaco-2細胞やMDCK細胞などの株化細胞を単層培養して用いた*in vitro*系が広く用いられている (Volpe, 2008; Volpe, 2011)。不死化細胞は多くの利点を有する一方で、これらの細胞は腫瘍細胞を起源としており、実際の生理的環境を正確に模倣していないため、ヒト*in vivo*における薬物動態を予測するにあたり、これらの細胞から得られたデータを外挿することは難しい (Le Ferrec et al., 2001)。例えばイヌの腎臓上皮由来のMDCK細胞は、播種後培養3日間で透過試験を行えるという利便性を持ち、目

的の薬物トランスポーターを強制発現させた系として用いることができるため、各基質薬物に合わせた透過試験の実施が可能である。しかし、医薬品候補化合物が、これらの基質になるかどうかの評価は出来るものの、完全なヒト消化管吸収率を予測することは困難である。ヒト結腸癌由来のCaco-2細胞はコラーゲンコートしたセルカルチャーインサートに細胞を播種し、2〜3週間培養することで極性を持った単層膜を形成し、微絨毛やタイトジャンクションのような小腸の円柱上皮細胞に似た形態学的特徴を示す。安価で取り扱いの容易な細胞モデルであることから、薬物の消化管吸収の評価系として現在最も汎用されている。しかし、ヒト小腸細胞とは薬物トランスポーターの発現パターンが異なるために(Le Ferrec et al., 2001; Sun et al., 2002; Harwood et al., 2015)、薬物トランスポーターの基質となるような薬物においてはヒトにおける吸収率を正確に予測することは難しく、モデル系としての限界がある。また、小腸の主要な薬物代謝酵素であるCYP3A4の発現レベルが非常に低い(Nakamura et al., 2002)という特徴があり、基質薬物の代謝の評価系には一般的に用いられない。さらに、腸管においては薬物トランスポーター同様に部位ごとに各薬物代謝酵素の分子種の発現量が異なることが報告されている (Zhang et al., 1999; Paine et al., 2006; Ohno and Nakajin, 2009; Brand et al., 2010) 。そこで、薬物相互作用の評価系としては、現在ヒト小腸ミクロソームやヒトCYP発現系ミクロソームが用いられ、リード化合物の各CYP分子種の寄与の割合や、プローブ基質代謝に対する影響から相互作用の評価が行われている (Paine et al., 1997; Galetin and Houston, 2006; Cubitt et al., 2009; Zhou et al., 2010) 。これらの理由から、現在の評価系では小腸で適切に薬物吸収と代謝の両方を包括的に評価することは難しい。

肝臓における初回通過効果の評価系としては、ヒト初代肝細胞が利用されている。同様に、小腸での初回通過効果の評価系としてヒト初代細胞を利用することは最も望ましいモデルであると考えられる。小腸のヒト初代培養細胞としては Human Whole Small Intestine Cells (DV Biologics、カリフォルニア州、米国) 、InEpi (Lonza、バーゼル、スイス)、HE3005 など (In Vitro ADMET Laboratories, Inc.、メリーランド州、米国)が挙げられるが Human Whole Small Intestine Cells と InEpi は胎児由来であり、HE3005 などは数に限りがあり入手困難である。さらに、ヒト小腸初代培養細胞は培養可能期間が非常に短いことが知られている(Grossmann et al., 1998)ため維持培養や継代が困難であることも相俟って非常に多くの細胞数を必要とする薬物スクリーニングなどにヒト小腸初代培養細胞を用いることは現実的ではない。このように、腸管における吸収過程を評価できる最適なモデルは未だに存在しない。従って、ヒト小腸細胞を低コストでかつ大量に供給する方法の確立は、現在の評価系の抱える様々な問題点を解決し、小腸における薬物動態をより正確に予測する糸口になると期待される。

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、ウイルスベクターを用いて体細胞に4つの遺伝子、

OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC を導入することによって樹立された(Takahashi et al., 2007)。

このヒトiPS 細胞は、1998 年にThomson らによって樹立されたヒト胚性幹細胞 (ES細胞) (Thomson et al., 1998) と同様な多分化能とほぼ無限の増殖能をもつ細胞である。多能性幹細胞の先行研究としてES 細胞は再生医療や細胞治療に利用できる可能性があることから、ヒトES 細胞が樹立された後、臨床応用を目指した研究が盛んに行われてきた。しかしES細胞を利用した研究では、2つの問題がある。1つ目は生命倫理的問題として、ES細胞樹立の際の操作である「ヒト胚の破壊」が容認されにくいことである。2つ目は医学的問題として、ES細胞により作製された組織または組織細胞を移植した際に拒絶は避けられないことである。これら二つの問題を解決する画期的な細胞としてiPS細胞が注目を集めている。しかし、ヒトiPS 細胞の利用は再生医療や細胞治療への応用だけに限ったことではない。例えば、稀少疾病や入手不可能な組織で生じる疾患等のメカニズムの解明にも応用されており、新薬の開発につながる事が期待される。さらに、薬物動態試験や毒性試験における研究支援材料としての利用など、ヒトiPS細胞を用いて様々な研究が盛んに行われている。

近年、ヒト iPS 細胞から正常小腸上皮細胞を作出しようと、様々な分化・培養方法の研究がなされているが、成熟した腸管上皮細胞への分化に関する報告は他の組織細胞と比べて極めて少ない。また、これまでの報告されている多能性幹細胞由来腸細胞では薬物動態学的な機能解析はほとんどなされていない。

Iwao らは、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導法の開発を行い、腸管への分化に効果的な低分子化合物 (PD98059、5-アザ-2'-デオキシシチジン および A-83-01) を見出してきた(Iwao et al., 2015)。これらを踏まえ、本研究では、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化に対して効果的な作用やシグナル経路について検証を行った。さらに、得られたヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の薬物動態学的機能についても解析を行った。

## 第二章 ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化

### 2.1 緒言

現在、ヒトiPS細胞から組織細胞への分化については、心筋細胞や神経細胞、肝細胞など様々な種類の細胞への分化に関して報告がされている(Imaizumi and Okano, 2014; Kondo et al., 2014; Takayama et al., 2014; Jha et al., 2015)。しかしながら、腸管上皮細胞への分化の報告は肝細胞と比較して顕著に少ない。例えば、Spenceらは、後部内胚葉のパターニングおよび、後腸の分化、形態形成においてはWnt/FGF経路が関与しているとの知見から(Wells and Melton, 2000; Dessimoz et al., 2006; McLin et al., 2007)、Wnt3AおよびFGF4を用いて初めてヒトiPS細胞から腸組織の形態学的特徴を持った腸管の3次元構造体(オルガノイド)の作製を報告した(Spence et al., 2011)。28日間培養した腸管オルガノイドの内部には微絨毛の存在が確認され、吸収上皮細胞、杯細胞、分泌細胞などの成熟した腸細胞の存在も確認された。また蛍光標識されたジペプチド( $\beta$ -Ala-Lys-AMCA)の取り込み能を有することも定性的に確認された。Ogakiらは腸の発達において、FGFファミリーやBMPおよびWnt/ $\beta$ -カテニンが内胚葉または隣接した中胚葉で発現し、内胚葉の領域形成で重要な役割を果たすとの報告から(Grapin-Botton and Melton, 2000; Fukuda and Kikuchi, 2005)、その中でもWnt経路とNotch経路に着目し、グリコーゲン・シンターゼ・キナーゼ-3 $\beta$ 抑制剤である6-ブロモインディルビン-3'-オキシム(BIO)およびNotchシグナルを阻害する $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬であるN-[ (3,5-ジフルオロフェニル) アセチル] -L-アラニル-2-フェニルグリシン-1、1-ジメチルエチルエステル(DAPT)を用いて、ヒトES/iPS細胞から腸管上皮を形成する吸収細胞と3種類の分泌細胞(杯状細胞、腸内分泌細胞およびパネート細胞)へと効率的に分化させる方法を報告した(Ogaki et al., 2013)。この細胞集団はPEPT1をはじめとする各種トランスポーターやCYP3A4をはじめとする主要な薬物代謝酵素を発現していた。しかしながら、Spenceらの報告にあるようなWnt3AやFGF4などの組み換えたんぱく質を用いる方法は、発生過程のシグナル伝達を模倣しており、分化には有用な方法であるものの、液性因子は非常に高価であることや因子の管理・保存にも注意が必要であることなどから、安価で簡単に腸管上皮細胞を得る方法としては課題が残る。また、Ogakiらによって報告されたBIO、DAPTを用いた分化培養方法は、腸細胞への分化に有効な低分子化合物を用いている点では非常に有用と考えられる。しかしながら、彼らが作出した腸細胞は分泌系細胞の発現が多く、その理由として、Notch阻害剤であるDAPTを用いていることが考えられる。Yangらの報告にあるように、Notchシグナルの活性化した前駆細胞ではHes1が活性化して吸収上皮細胞へと分化していくが、その一方で、Notchシグナルが不活性化されてAtoh1を発現するようになった前駆細胞

は分泌系細胞へと分化することが明らかとなっている(Yang et al., 2001)。小腸上皮においては、吸収上皮細胞が90%以上を占め、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターは、この吸収上皮細胞に発現していることから、経口薬の吸収評価系としては、分泌細胞化よりも吸収上皮細胞への分化へ導くことが重要であると考ええる。また、これらの報告されたヒト多能性細胞由来腸細胞は、正常ヒト小腸細胞と比較すると薬物代謝関連遺伝子の発現が低く、さらに、薬物動態学的機能の評価はほとんどなされていない。したがって、ヒト多能性細胞由来腸細胞を将来的に創薬研究の新たな評価系として用いるためには、既存の腸細胞への分化誘導方法の改善が必須である。

本研究室ではこれまでに、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化法を独自に開発してきた(Iwao et al., 2014)。さらに、分化効率の改善を目的として安価で取り扱いの容易な低分子化合物に着目し、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞の分化に効果的な複数の低分子化合物、PD98059、5-アザ-2'-デオキシシチジン および A-83-01を見出した(Iwao et al., 2015)。このヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は各種薬物代謝酵素活性と活性型ビタミンD<sub>3</sub>によるCYP3A4誘導能を有することを明らかとし、これらの低分子化合物は吸収上皮細胞への分化を促進して、薬物動態学的機能の獲得に寄与していることが示された。PD98059はMEK阻害剤、5-アザ-2'-デオキシシチジンはDNAメチル化転移酵素(DNMT)阻害剤およびA-83-01はTGF-β阻害剤として販売されているが、これら低分子化合物の細胞への作用は様々である。

そこで本研究において、この点を明らかにするために、PD98059、5-アザ-2'-デオキシシチジン および A-83-01の主要な作用であるMAP経路、DNMTおよびTGF-βの阻害作用を有する化合物を複数用いて、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化に対する影響を評価することにした。用いた低分子化合物の根拠を以下に述べる。

MEK は MAP キナーゼの上流に位置するプロテインキナーゼファミリーであり、MAP経路の活性化に重要な働きをすることが知られており、MEK ファミリーには MEK1 から7まである。MEK が作用する経路としては主に Jun-N 末端キナーゼ (JNK)、p38、細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) が知られている。MAPK の活性化ループのリン酸化を担うのは、セリン/スレオニン/チロシンキナーゼに属する MAPKK であり、ERK1/2 の活性化には MEK1・MEK2 が、JNK サブファミリーには MKK4・MKK7、p38 サブファミリーには MKK3・MKK6、ERK5 サブファミリーの活性化には MEK5 が各々関与している。PD98059 は不活性型の MEK1 に結合し、Raf によるリン酸化を妨げるが、すでに活性化している MEK1 にはほとんど作用しないことが知られている (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995; Favata et al., 1998)。この不活性型 MEK1 選択的阻害作用が腸管上皮細胞への分化に重要なのかということは不明であった。そこで、活性型 MEK1 についても強い阻

害作用を示す U0126、MEK1 だけでなく MEK2 に対しても阻害効果を持つ PD184352、MAPK その他にも非特異的に MEK を阻害する PD0325901、MKK3/p38 経路にも阻害作用を示すことが知られている SL327 といったいくつかの MEK 阻害剤を選択した。

5-アザ-2'-デオキシシチジンは濃度依存的にゲノム DNA の脱メチル化を引き起こす、シチジン類縁体の DNA メチル化阻害剤である。DNA のメチル化には、非メチル化 DNA が新たにメチル化される *de novo* メチル化活性と呼ばれるものと、DNA 複製時に親鎖 DNA 上のメチル化パターンを新生 DNA 鎖上に写し取る維持型の DNMT 活性が存在する。DNA メチル化は、DNMT1、DNMT3A および DNMT3B を含む DNMT のファミリーによって媒介される(Okano et al., 1998)。DNMT の中でも DNMT1 は維持メチル基活性が極めて高く、DNMT3 は *de novo* の活性が高い。また、Song らはマウスの精子形成段階に 5-アザ-2'-デオキシシチジンを処理することによって DNA メチル化レベルを低下させ、細胞傷害性を示し、生殖細胞をアポトーシスに導くこと、また、各分化段階で DNMT1 と DNMT3 に対する 5-アザ-2'-デオキシシチジンの効果も異なることを報告した(Song et al., 2016)。その一方で、Kondo らは、DNA の転写が促進方向に働く効果を示すヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤であるバルプロ酸を用いて、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に効果的であるとの報告をしている(Kondo et al., 2014)。これらの報告から DNMT 阻害による DNA の転写の促進が細胞分化に働く可能性とアポトーシスに働く可能性の 2 つがある。そこで DNMT 阻害剤が腸管上皮細胞への分化に効果的であるかを調べるために複数の DNMT 阻害剤を用いて分化させた。

A-83-01 は TGF- $\beta$  阻害剤である。A-83-01 を細胞分化に用いた報告としては以下のようなものがある。間葉系細胞培養時に添加することにより分化・アポトーシスを抑制し維持培養が可能になる(Gurung et al., 2015)。またマウスにおいて心筋芽細胞や神経細胞の分化の方向づけに効果を示すとの報告もある(Chen et al., 2015)。腸管においては Sato らの報告によるとヒト消化管由来オルガノイドの幹細胞性を維持したまま培養するには A-83-01 が必要だと報告している(Sato et al., 2011)。このように A-83-01 が未分化性の維持に効果を示すのか分化に効果を示すのか様々な報告があり、腸管上皮細胞への分化に A-83-01 の作用である TGF- $\beta$  阻害効果が腸管上皮細胞への分化・成熟方向に効果的であるのかを調べるために複数の TGF- $\beta$  阻害剤を選択し分化に用いた。

さらに、薬物動態学的機能の評価として得られたヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞における薬物代謝酵素活性および CYP3A4 誘導能について解析を行った。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試薬及び細胞

マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) はオリエンタル酵母社 (東京) より、BD マトリゲル™基  
底膜マトリックス (成長因子を減じたもの) (Matrigel) はBD バイオサイエンス社 (マサ  
チューセッツ州ベッドフォード、米国) より、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 、  
DMEM/ハムF-12 培地 (DMEM/F12) 、2-メルカプトエタノール (2-ME) 、L-グルタミン溶液  
(L-Glu) 、GW788388水和物、PD184352、PD-184161、SL327、5-アザシチジン、RG108、  
zebularine、RepSoxおよびLY-364947はシグマアルドリッチ社 (ミズーリ州セントルイス、米  
国) より、KnockOut™血清代替(KSR) 、ロズウェルパーク記念研究所培地 (RPMI 1640 培  
地、グルタマックス含有) 、グルタマックス、最小必須培地用非必須アミノ酸 (MEM NEAA)  
はインビトロジェン社 (カリフォルニア州カールスバッド、米国) より、ウシ胎仔血清  
(FBS) はハイクロン社 (マサチューセッツ州ウォルサム、米国) より、線維芽細胞増殖因  
子 (FGF) 2、アクチビンA、上皮成長因子 (EGF) はペプロテック社 (ニュージャージー  
州ロッキーヒル、米国) より、アクターゼはエムエステクノシステムズ社 (大阪) より、リ  
ファンピシン (RIF) 、ジメチルスルホキシド (DMSO) 、PD0325901、U0126、D4476、  
PD98059、5-アザ-2'-デオキシシチジン、3-(6-メチル-2-ピリジニル)-N-フェニル-4-(4-キ  
ノリニル)-1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド (A-83-01)、1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミン  
D<sub>3</sub>、(+)-(R)-トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル) シクロヘキサンカルボキサミド  
二塩酸塩 (Y-27632) は和光純薬工業社 (大阪) より、MEK inhibitor II はメルクミリポア社  
(マサチューセッツ州ビレリカ、米国) より、RNeasy Mini Kit はキアゲン社 (カリフォルニ  
ア州バレンシア、米国) より、PrimeScript RT Reagent Kit および TaKaRa SYBR Premix EX  
Taq IIはタカラバイオ社 (滋賀) より、霊長類ES/iPS 細胞用細胞剥離液はリプロセル社 (東  
京) より購入して用いた。その他の試薬は全て市販の高速液体クロマトグラフ用もしくは特  
級品を用いた。

### 2.2.2 ヒト iPS 細胞の培養

ヒト胎児肺線維芽細胞 (MRC-5) から樹立されたヒト iPS 細胞 (Windy) は、国立成育医  
療研究センター研究所の梅澤明弘博士よりご供与いただいた。ヒトiPS 細胞は20% KSR、1%  
MEM NEAA、2 mM L-Glu、0.1 mM 2-ME、5 ng/mL FGF2を含むDMEM/F12 を用いて、マイ  
トマイシンC 処理により不活化したMEF上で培養した。培地交換は毎日行い、3~4 日毎に  
霊長類ES/iPS 細胞用細胞剥離液を用いて剥離し、継代培養を行った。

### 2.2.3 ヒト iPS 細胞の腸管上皮細胞への分化

分化には継代数が40から50までのヒトiPS細胞を用いた。ヒトiPS 細胞の腸管上皮細胞への分化は、ヒトiPS 細胞未分化コロニーの占める割合が培養皿に対し約70%になった状態で開始した。2 mM GlutaMAXを含む、0.5% ウシ胎仔血清 (FBS)、100 ng/mL アクチビンA、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地で48時間、2 mM GlutaMAX、2% FBS、100 ng/mLアクチビンA、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン を含むRPMI 1640培地で24時間培養することで内胚葉へ分化させた。その後、2% FBS、2 mM GlutaMAX、250 ng/mL FGF2を含むDMEM/F12培地で96時間培養することにより小腸幹細胞まで分化させた。その後、細胞はセリンスレオニン蛋白リン酸化酵素の阻害剤である10 µM Y-27632で1時間処理後、アクターゼを用いて5分間処理することにより剥離し、あらかじめヒトiPS細胞用培地で30倍に希釈したMatrigelにてコーティングした24ウェルプレートまたは96ウェルプレートに播種した。なお、細胞は2% FBS、2% B-27 サプリメント、1% N2 サプリメント、1% MEM NEAA、2 mM L-Glu、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、20 ng/mL EGF を含むDMEM/F12培地で19日間培養した。10 µM Y-27632 は播種後24時間まで添加した。また、分化開始14日目より、3つの低分子化合物 (MEK、DNMTおよびTGF-β阻害剤からそれぞれ1つずつ) を添加し、成熟した腸管上皮細胞へ分化した。低分子化合物の添加濃度は溶解度やIC<sub>50</sub>といった物質的特徴と報告などから*in vitro*系で用いられている濃度を参考に十分な効果が期待できる濃度に設定した。低分子化合物の希釈標準溶液はDMSOもしくは滅菌水により溶解し用いた。分化開始8日目以降は3日毎に培地交換した。

### 2.2.4 誘導剤処理

薬物代謝酵素の誘導剤は以前に報告された濃度を参考に(Kondo et al., 2014; Iwao et al., 2015)、10 nM 1α,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> あるいは40 µM RIF を分化終了48時間前に添加培養することで行った。

### 2.2.5 RNA 抽出及び逆転写 (RT) 反応

総 RNA はヒトiPS 細胞の分化誘導終了後、RNeasy Mini Kit (キアゲン社、カリフォルニア州バレンシア、米国) の添付マニュアルに従い抽出した。First-strand cDNAの合成はPrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ社) を使用し、500 ng の総RNA から添付マニュアルに従い行った。



### 2.2.6 リアルタイム RT-PCR 解析

PCR プライマーは、Table 1 に示したものをを用いた。リアルタイムRT-PCR の反応混合液はSYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) (タカラバイオ社、滋賀) を用い、反応はアプライドバイオシステムズ7300 リアルタイムPCR システム (アプライドバイオシステムズ社、カリフォルニア州フォスターシティ、米国) を用いて行った。結果は内在性コントロールとしてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を用いて補正した。

**Table 1. Sequences of primers for real-time PCR analysis**

Gene names	Sense (5' →3' )	Antisense (5' →3' )	Product length (bp)
LGR5	TGCTCTTCACCAACTGCATC	CTCAGGCTCACCAGATCCTC	193
Sucrase–isomaltase	GGTAAGGAGAAACCGGGAAG	GCACGTCGACCTATGGAAAT	195
CYP3A4	CTGTGTGTTTCCAAGAGAAGTTAC	TGCATCAATTCCTCCTGCAG	298
SLC15A1/PEPT1	CACCTCCTTGAAGAAGATGGCA	GGGAAGACTGGAAGAGTTTTATCG	105
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	185

### 2.2.7 薬物代謝酵素活性測定

薬物代謝酵素活性の測定は、以下の方法によって行った(Kondo et al., 2014; Iwao et al., 2015)。

ヒト iPS 細胞から分化した細胞は、CYPs、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) とスルホトランスフェラーゼ (SULT) のプローブ基質 (CYP 1A : フェナセチン、CYP2B6 : ブプロピオン、CYP2C9 : ジクロフェナク、CYP2C19 : S-メフェニトイン、CYP2D6 : ブフラロール、CYP3A4/5 : ミダゾラム、そして UGT および SULT : 7-ヒドロキシクマリン) を含む分化培地で24 時間、37°Cでインキュベートした。そして、安定同位体で標識された内部標準物質を含む氷冷したアセトニトリルを加えることで反応を停止させた。代謝物であるアセトアミノフェン、ヒドロキシブプロピオン、4'-ヒドロキシジクロフェナク、4'-ヒドロキシメフェニトイン、1'-ヒドロキシブフラロール、1'-ヒドロキシミダゾラム、7-ヒドロキシクマリリングルクロニド、および 7-ヒドロキシクマリンサルフェートは、超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (UPLC-MS/MS) によって定量した。測定結果はPierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., ウォルサム、マサチューセッツ州、米国) を用いてタンパク定量を行うことにより補正した。なお、代謝物の解析は田辺三菱製薬 (東京) 薬物動態研究所堀川隆司博士、丹羽卓朗氏に行って頂いた。

### 2.2.8 統計解析

多重比較は、分散分析を行った後、ダネット法を用いて実行した。その際の統計分析は、PASW Statistict 18 system software を用いて行われた (IBM、ニューヨーク州アモンク、米国)。

## 2.3 結果

### 2.3.1 腸管上皮細胞への分化に対する MEK、DNMT および TGF- $\beta$ 阻害剤の効果

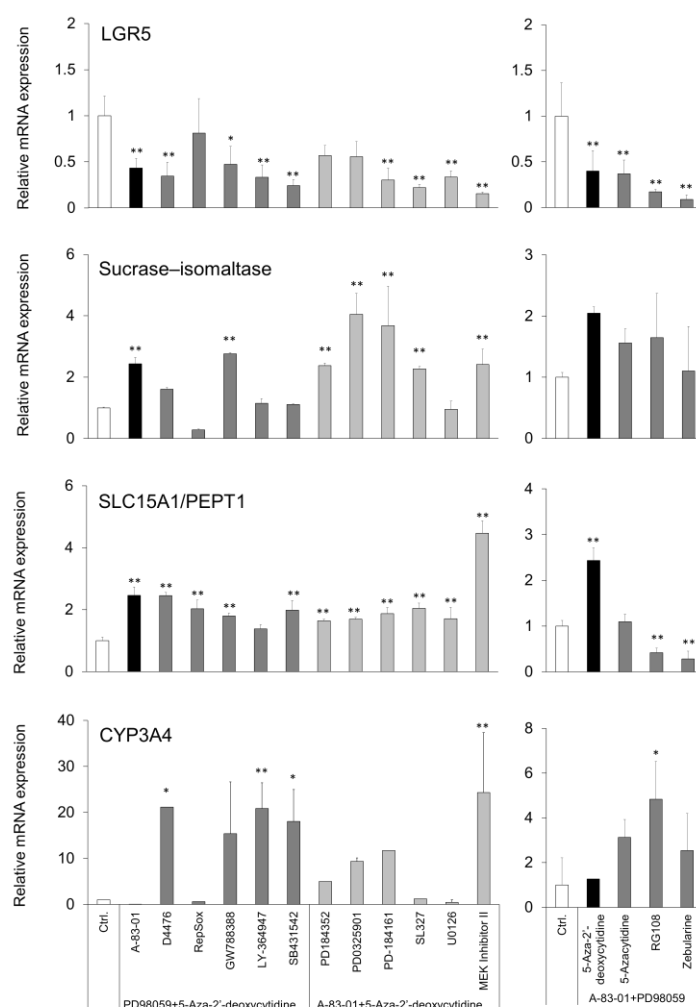
低分子化合物の主要な作用である MAP 経路、DNMT および TGF- $\beta$  の阻害作用を有する化合物を用いてヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化に対する影響を評価するために、Iwao ら (2015) が以前報告した化合物の組み合わせ (PD98059、5-アザ-2'-デオキシシチジン および A-83-01) を基本とし、MEK 阻害剤 7 化合物、DNMT 阻害剤 4 化合物および TGF- $\beta$  阻害剤 6 化合物の中から 1 つを選択し、腸管上皮細胞への分化時に添加した。分化の際に用いた低分子化合物を Table 2 に示した。分化終了後、細胞の分化成熟の程度を各マーカーの mRNA 発現レベルにより解析した。

**Table 2. List of MEK, DNMT, and TGF- $\beta$  inhibitors used in this study**

Groups	Compounds	Final concentrations
MEK Inhibitors	PD184352	1 $\mu$ M
	PD98059	20 $\mu$ M
	PD 0325901	1 $\mu$ M
	PD-184161	10 $\mu$ M
	SL327	10 $\mu$ M
	U0126	10 $\mu$ M
	MEK Inhibitor II	10 $\mu$ M
DNMT Inhibitors	5-Aza-2'-deoxycytidine	5 $\mu$ M
	5-Azacytidine	10 $\mu$ M
	RG108	10 $\mu$ M
	Zebularine	10 $\mu$ M
TGF- $\beta$ Inhibitors	A-83-01	0.5 $\mu$ M
	SB431542	10 $\mu$ M
	D4476	10 $\mu$ M
	RepSox	10 $\mu$ M
	LY-364947	10 $\mu$ M
	GW788388 Hydrate	20 $\mu$ M

mRNA発現レベルは低分子化合物非添加群であるコントロール群と比較して、小腸幹細胞マーカーとして知られるロイシンリッチ反復領域を有するG-タンパク質共役型レセプター (LGR5) (Barker et al., 2007) は低分子化合物の添加により減少した (Fig. 1)。それとは対照的

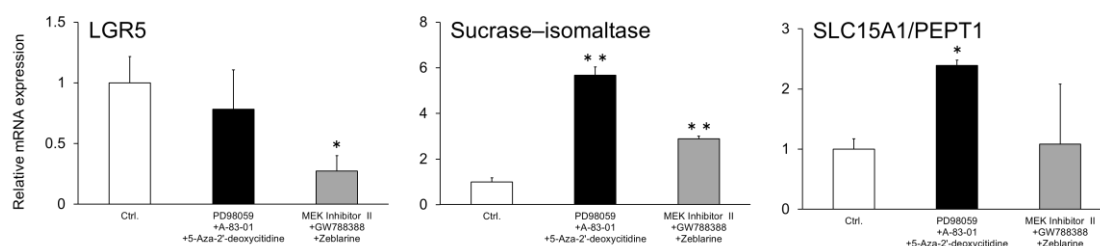
に、腸管上皮細胞特異的マーカーであるスクラーゼ-イソマルターゼ (Gu et al., 2007)の発現はRepSoxを除いて同等もしくはそれ以上に増加した。小腸でのペプチドの吸収に関わるペプチドトランスポーター (SLC15A1/PEPT1) (Liang et al., 1995)と主要な薬物代謝酵素であるCYP3A4の発現はいずれの群においても概ね増加した。特に、LGR5とSLC15A1/PEPT1 のmRNAの発現に対して、低分子化合物の効果は顕著だった。



**Fig. 1. Effects of small-molecule compounds on the intestinal differentiation of human iPS cells**  
Human iPS cells were cultured in the presence of activin A for 3 days. The cells were further cultured in the medium containing FGF2 for 4 days and then in the presence of EGF for 19 days and of small-molecule compounds for 18 days. We selected two compounds from among PD98059, 5-aza-2'-deoxycytidine, and A-83-01 and one compound from another inhibitor group. After 26 days of differentiation, total RNA was extracted and mRNAs were analyzed by SYBR Green real-time PCR. The mRNA expression levels were normalized relative to those of GAPDH. Gene expression levels are represented relative to the level in the control group, which is set as 1. The group in the absence of small-molecule compounds (shown as an open column) was used as control (Ctrl.) . The closed columns show our previously reported combination. Data are presented as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 2$  or 3) . There are columns of  $n = 2$  group because sufficient mRNA was not obtained. Levels of statistical significance compared with the nontreatment group: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

### 2.3.2 MEK Inhibitor II、Zebularine および GW788388 水和物の効果

上述のマーカー遺伝子の発現結果と分化培養時の細胞毒性の結果を踏まえて、TGF- $\beta$  阻害剤の中でスクラーゼ-イソマルターゼの遺伝子発現の最も高かった GW788388 水和物を選択した。MEK 阻害剤の中からは PEPT1 と CYP3A4 の遺伝子発現が高かった MEK Inhibitor II を選択した。最後に DNMT 阻害剤の中で最も細胞死の少なかった zebularine を選択し、それら 3 化合物の組み合わせが分化成熟に与える効果について検討した。MEK inhibitor II、zebularine および GW788388 水和物を組み合わせることで、LGR5 の mRNA 発現は低分子化合物非添加群の 30%にまで減少した (Fig. 2)。スクラーゼ-イソマルターゼの mRNA は 2.9 倍に上昇した。一方、PEPT1 の発現は有意な差は認められなかった。特に MEK inhibitor II、zebularine および GW788388 水和物の組み合わせで分化した際の LGR5 とスクラーゼ-イソマルターゼの mRNA 発現は統計学的にも有意な差が認められ、これらの結果は PD98059、5-アザ-2'-デオキシシチジンおよび A-83-01 の組み合わせを用いて分化させた群と同様の傾向を示した。



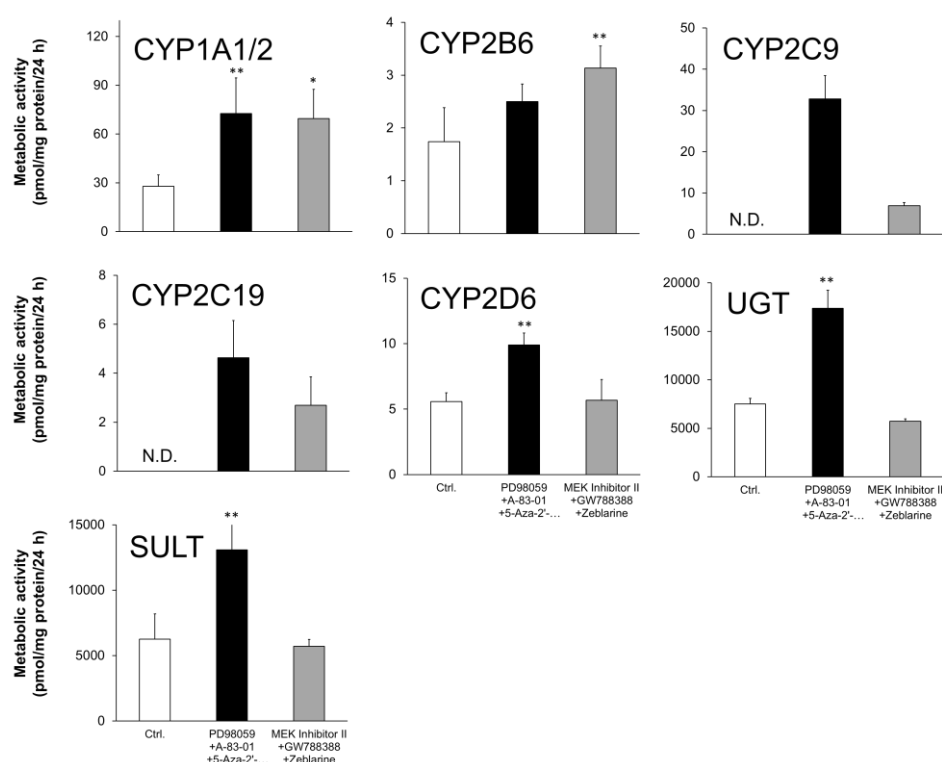
**Fig. 2. Relative mRNA expression levels of LGR5, sucrase-isomaltase, and SLC15A1/PEPT1 in differentiated enterocyte-like cells**

Human iPS cells were cultured in the presence of activin A for 3 days. The cells were further cultured in the medium containing FGF2 for 4 days and then in the presence of EGF and small-molecule compounds for 19 days. Small-molecule compounds were added with combinations of PD98059, 5-aza-2'-deoxycytidine, and A-83-01 or of MEK inhibitor II, zebularine, and GW788388. After 26 days of differentiation, total RNA was extracted and mRNAs were analyzed by SYBR Green real-time PCR. The mRNA expression levels were normalized relative to that of GAPDH. Gene expression levels are represented relative to the level in the control group, which is set as 1. The group in the absence of small-molecule compounds (shown as an open column) was used as control (Ctrl). The closed columns show combinations previously reported. Data are presented as means  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). Levels of statistical significance compared with the nontreatment group: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

### 2.3.3 薬物代謝酵素活性

次に、得られたヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の動態学的機能として薬物代謝酵素について評価した。各種 CYP 分子種、UGT および SULT に対する薬物代謝活性測定の結果を Fig. 3 に示す。低分子化合物非添加群であるコントロール群と MEK inhibitor II、zebularine およ

び GW788388 水和物の組み合わせを比較すると、CYP1A1/2 と CYP2B6 の代謝活性は有意に増加した。一方、CYP2D6、UGT および SULT の代謝活性は有意な変化は認められなかった。特に CYP2C9 と CYP2C19 の代謝酵素活性は低分子化合物非添加群では検出されなかったが低分子化合物の添加によって活性が確認された。



**Fig. 3. Activities of CYP1A1/2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, UGT, and SULT in differentiated enterocyte-like cells**

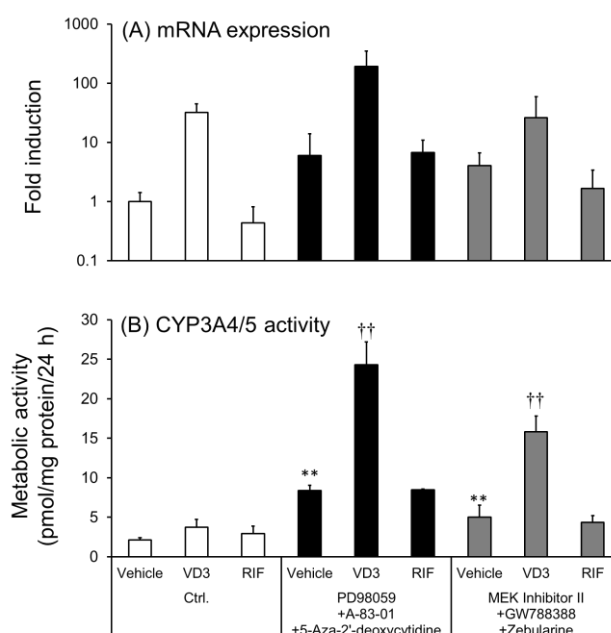
Human iPS cells were cultured in the presence of activin A for 3 days. The cells were further cultured in the medium containing FGF2 for 4 days and then in the presence of EGF and small-molecule compounds for 19 days. Small-molecule compounds were added as combinations of PD98059, A-83-01, and 5-aza-2'-deoxycytidine or of MEK inhibitor II, GW788388, and zebularine.

After 26 days of differentiation, the differentiated cells were incubated with basal medium containing CYP, UGT, and SULT probe substrates for 24 h. The supernatant was recovered and metabolites were analyzed by UPLC-MS/MS. The group in the absence of small-molecule compounds (shown as an open column) was used as control (Ctrl). The closed columns show combinations previously reported. Data are presented as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ). N.D., not detected; Ctrl, control. Levels of statistical significance compared with the nontreatment group: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

### 2.3.4 CYP3A4 の mRNA 発現誘導と代謝酵素活性

CYP3A4 は小腸において主要な薬物代謝酵素である。その発現は  $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン  $D_3$  の添加によって誘導されることが知られている (Schmiedlin-Ren et al., 2001)。そこで次に CYP3A4 の mRNA 発現、代謝活性そして誘導能について検討した。mRNA の発現は低分子化合物の添加によって 4.1 倍から 6.0 倍まで増加した (Fig. 4)。さらに、低分子化合物

を添加した群においては  $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン  $D_3$  の添加によって mRNA の発現は 6.4 倍から 31.9 倍の誘導が認められた。一方、RIF の添加による誘導は認められなかった。CYP3A4/5 の活性も mRNA 発現と同様の傾向を示し、低分子化合物の添加によって増加した。さらに、それらの活性は RIF によって誘導は認められなかったものの、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン  $D_3$  の添加によっておよそ 3 倍の有意な誘導が認められた。



**Fig. 4. Induction of CYP3A4 mRNA expression level and CYP3A4/5 activity in differentiated enterocyte-like cells by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  and rifampicin**

Human iPS cells were cultured in the presence of activin A for 3 days. The cells were further cultured in the medium containing FGF2 for 4 days and then in the presence of EGF and small-molecule compounds for 19 days. Small-molecule compounds were added with the combination of PD98059, 5-aza-2'-deoxycytidine, and A-83-01 or of MEK inhibitor II, zebularine, and GW788388.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  (VD3) and rifampicin (RIF) were supplied for the last 48 h. After 26 days of differentiation, in CYP3A4 mRNA expression analysis, total RNA was extracted and mRNAs were analyzed by SYBR Green real-time PCR. The mRNA expression levels were normalized relative to that of GAPDH. For a drug-metabolizing enzyme activity analysis, the differentiated cells were incubated with the medium containing midazolam, a CYP3A4 / 5 probe substrate, for 24 h. The supernatant was recovered and metabolites were analyzed by UPLC-MS/MS. The group in the absence of small-molecule compounds (shown as an open column) was used as control (Ctrl). The closed columns show combinations previously reported. Induction of CYP3A4 is represented relative to the level in the nontreatment (vehicle), which is set as 1. Data are presented as means  $\pm$  SD [ $n = 3$  (A),  $n = 4$  (B)]. Ctrl, control:  $**P < 0.01$ . Levels of statistical significance compared with those of the nontreatment group of VD3 and RIF:  $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ .

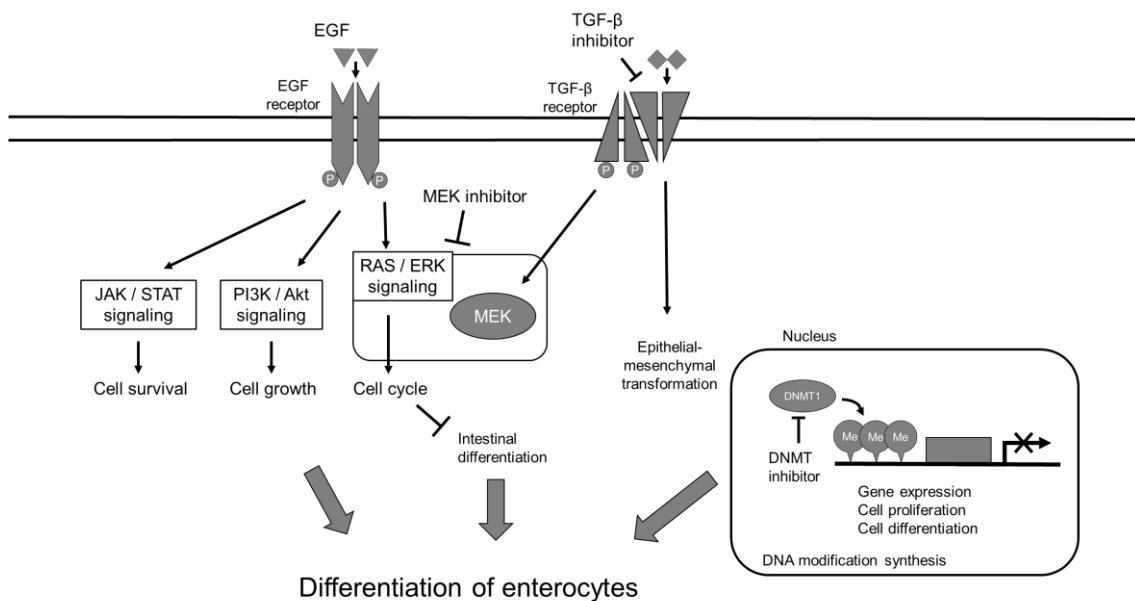


## 2.4 考察

本章ではこれまでに見出したヒトiPS細胞から腸管上皮細胞の分化に効果的な複数の低分子化合物 (PD98059、5-アザ-2'-デオキシシチジン および A-83-01) の主要な作用であるMAP経路、DNMTおよびTGF- $\beta$ の阻害作用を有する化合物を組み合わせ、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化に対する影響を評価した。低分子化合物を添加し分化させたヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は、腸管上皮細胞に発現するマーカー遺伝子の発現が上昇し、多くの低分子化合物の組み合わせによって腸管上皮細胞への分化を促進させることが明らかとなった (Fig. 1、2)。しかし、それぞれの低分子化合物の組み合わせのなかには、低分子化合物非添加群と比較して全ての腸管上皮細胞に発現するマーカー遺伝子のmRNA発現の上昇させたものもあれば、同等または減少してしまう組み合わせもあった。本検討に用いた低分子化合物の添加濃度はIC<sub>50</sub>や報告にある濃度を参考に用いたが、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化に最適な濃度の検討や添加時期の検討は行わなかったため、より成熟した腸管上皮細胞を得るためには各低分子化合物が腸管上皮細胞への分化に最適な条件を明らかにする必要があると考えられた。また、分化したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は各種薬物代謝酵素活性と1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>によるCYP3A4のmRNA発現と代謝活性の誘導が確認された (Fig. 4)。一方、RIFの添加による誘導は認められなかった。結果には示していないが、分化した細胞の全ての群においてCYP3A4の転写に関わる核内受容体であるプレグナンX受容体 (PXR) のmRNAの発現レベルはヒト成人小腸の0.2~0.5%と低かった。このことから、分化した腸管上皮細胞におけるPXRの低発現が原因で、その下流のCYP3A4プロモーターの活性化が十分に行われなかったものと考えられた。これらの結果よりMEK、DNMTおよびTGF- $\beta$ 阻害作用を有する低分子化合物をすべて組み合わせることで、ヒトiPS細胞から機能的な腸管上皮細胞への分化を促進することが示唆された。

本研究では、MEK、DNMTおよびTGF- $\beta$ 抑制剤がどのようなメカニズムによってヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化を促進するのかということについて詳細な解析は行ってい

ないが、以下のようなことが考えられる (Fig. 5)。



**Fig. 5. A scheme of the approach for systematic differentiation of human iPS cells into enterocytes**

MAPキナーゼ細胞内シグナル経路は細胞増殖、分化、アポトーシス、生存、転移といった様々な細胞機能の調節に関与している。その1つであるRaf/MEK/ ERK 経路は、細胞分化および増殖制御に関与している。腸管においてERK経路は、クリプト底部の増殖細胞では活性化され、絨毛上部の分化した細胞では抑制されていることが知られている (Laprise et al., 2004; Lemieux et al., 2011)。実際に、MEK/ERKカスケードが活性されると、タイトジャンクションを形成する遺伝子群の発現や腸管の分化が抑制されると報告されている (Lemieux et al., 2011)。従って、ERK経路の不活化は、成熟した腸管上皮細胞への終末分化に必要であると考えられる。

分化開始7日目より加えているEGFの受容体である上皮成長因子受容体 (EGFR) は、細胞外タンパク質リガンドのEGF-ファミリーのメンバーに対する細胞表面受容体である (Herbst, 2004)。EGFにより引き起こされるEGFRの自己リン酸化により、RAS / ERK経路、ホスファ

チジリイノシトール3-キナーゼ/AKT (PI3K/AKT) 経路、およびヤヌスキナーゼ/シグナル伝達性転写因子 (JAK/STAT) 経路といった様々な経路が活性化されることが知られている。RAS/ERK経路は細胞周期を、PI3K/AKT経路は細胞成長をそしてJAK/STAT経路は細胞生存をそれぞれ制御し細胞の生存成長を促進するように働いていることが知られている (Oda et al., 2005)。EGFによりiPS細胞由来腸管上皮細胞の生存、増殖および成長を促進しMEK阻害剤の添加により細胞分裂ではなく成熟腸管上皮細胞へ成長させる方向づけに効果を示していると考えられる。

DNAのメチル化、ヒストンテールドメインの修正、クロマチン・リモデリングおよび非翻訳性RNAの発現などにより起こるエピジェネティックな修飾は、DNAの配列を変えることなく遺伝子発現に影響を及ぼすことが知られている (Huang and Fan, 2010; Jin et al., 2011; Moore et al., 2013)。その中でも、DNAのメチル化は転移抑制効果と反復エレメントの安定効果によって、ゲノムの安定性に寄与している (Huang and Fan, 2010)。腸上皮への分化において、DNAのメチル化はエンハンサーのアクセス性を制御することによって、遺伝子発現の抑制・活性化の役割を担う (Sheaffer et al., 2014)。ヒト結腸癌由来細胞株を用いた検討ではDNMT阻害剤である5-アザ-2'-デオキシシチジンを処理することによって、CYP3A4のmRNA発現が増加したことから、PXRのプロモーター領域のメチル化がPXRやCYP3A4の発現に関与していることが報告されている (Habano et al., 2011)。従って、DNMT阻害剤は腸管上皮細胞の機能獲得や分化に重要な遺伝子発現を促すことから、ヒトiPS細胞からの分化にも有用である可能性が考えられた。

生体内では上皮細胞の下層に間充細胞が位置し上皮細胞の形成促進、または自身が筋組織へ分化することで腸管組織の恒常性が維持されていることが知られている (Smith, 1985)。発生段階では、細胞の分化は上皮-間充細胞間相互作用に依存し (Sanders, 1988)、胚発生の初期において、上皮から間充細胞、また間充細胞から上皮へ形態を変化させる現象 (上皮間葉転換 (EMT)) がみられる。EMTはほとんどの器官形成に必須であり (Thiery, 2002)、そのプロセス

は、コラーゲン、TGF- $\beta$ 、FGFおよびEGFといった細胞外シグナルでの分子相互作用によって引き起こされる(Kong et al., 2011)。成長因子であるTGF- $\beta$ は主要なシグナル経路の活性化と転写制御因子の結合によって様々な生体系と病態生理学的状況でEMTを起動、維持することができる(Zavadil and Bottinger, 2005)。TGF- $\beta$ シグナルは、TGF- $\beta$ タイプI受容体であるALK5とSmad2/3タンパク質により伝えられ、EMTを介在するとの報告がある(Piek et al., 1999)。本研究で用いたA-83-01はALK4、ALK5、ALK7の選択的阻害剤であり、腸管上皮に高発現しているBMP経路の受容体ALK2、3、6を阻害しない。また、A-83-01は、p38 MAPキナーゼおよび細胞外制御キナーゼにほとんど影響せずに、Smad2/3のリン酸化やTGF- $\beta$ 誘導性の上皮間充織転換を阻害することが報告されている(Tojo et al., 2005)。従って、TGF- $\beta$ 阻害剤を用いることで腸管上皮細胞への分化を妨げることなく、上皮細胞が間充織細胞へ転換するのを抑制したことから、分化に対して効果的であったものと考えられた。

以上のことから、MEK、DNMTおよびTGF- $\beta$ 阻害剤のすべてを用いることで、さまざまなメカニズムを介してヒトiPS細胞から腸管への分化促進や機能獲得に有用であることが考えられた。

## 2.5 小括

本章ではこれまでに見出したヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化に有用な低分子化合物 (PD98059、5-アザ-2'-デオキシシチジンおよび A-83-01) の主要な作用であるMAP経路、DNMTおよびTGF- $\beta$ の阻害作用を有する化合物を用いてヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化に対する影響を評価した。

分化した細胞は、腸のマーカー遺伝子と薬物動態学的関連遺伝子を発現しており、各種薬物代謝酵素活性および1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>によるCYP3A4の誘導能も有していた。これに加えて、MEK、DNMTおよびTGF- $\beta$ 阻害剤は、多くの組み合わせによってヒトiPS細胞から薬物動態学的機能を有する腸管上皮細胞への分化に効果的であることが示された。従って、MEK、DNMTおよびTGF- $\beta$ 阻害剤をすべての組合せて用いることで、創薬研究に利用可能な薬物動態学的機能を獲得した腸管上皮細胞を作製できる可能性が示唆された。

### 第三章 ヒトiPS 細胞由来腸管上皮細胞を利用した薬物の消化管吸収に関する特性解析

#### 3.1 緒言

これまでにヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いた薬物の膜透過性を直接的に評価した報告はほとんどない(Kauffman et al., 2013; Ozawa et al., 2015)。例えば、Kauffman らはヒト iPS 細胞から分化させた細胞をセルカルチャーインサート上に播種し、経上皮電気抵抗 (TEER) 値の測定と非吸収性マーカーであるフルオレセインイソチオシアネートデキストラン 1500000(分子量 1500000、FD150) を用いた膜透過試験から、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞層はタイトジャンクションを形成していることを報告している。また、Ozawa らも作製したヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞層における TEER 値、非吸収性マーカーであるフルオレセインイソチオシアネートデキストラン 4000 (分子量 4000、FD-4) の膜透過性およびタイトジャンクションのマーカーである zo-1 の免疫蛍光学的染色によりタイトジャンクションを形成していることを同様に報告している。このように、これらの報告は分化した iPS 細胞由来の腸管細胞がタイトジャンクションを有していることを示すのみに留まっていた。ヒト iPS 細胞由来腸細胞が Caco-2 細胞に代わる吸収評価系として利用するためには Caco-2 細胞を始めとする細胞モデル系と同様に膜透過試験が可能かを検討する必要がある。前章で述べたように、MAP 経路、DNMT および TGF- $\beta$  阻害効果をもつ低分子化合物を用いて作製した腸管上皮細胞が各種薬物代謝酵素活性および小腸に特徴的な薬物応答性を獲得していることを明らかとしている。

そこで本研究では、作製したヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞における薬物の吸収に関する様々な特性解析を行った。具体的には細胞層の形態学的特徴、取り込みおよび排出トランスポーターを介した薬物輸送試験およびヒト消化管における吸収率 ( $F_a$ ) が既知の薬物を用いた膜透過試験により評価した。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試薬および細胞

MEFはオリエンタル酵母社（東京）より、MatrigelはBD バイオサイエンス社（マサチューセッツ州ベッドフォード、米国）より、DMEM、DMEM/F12、2-ME、L-Glu、およびKo143はシグマアルドリッチ社（ミズーリ州セントルイス、米国）より、KSR、RPMI 1640 培地、グルタマックス、MEM NEAA、 Alexa Fluor®568 標識ヤギ抗マウスIgG 抗体およびAlexa Fluor 488 ロバ抗ウサギIgG抗体はインビトロジェン社（カリフォルニア州カールスバッド、米国）より、FBSはハイクローン社（マサチューセッツ州ウォルサム、米国）より、FGF2、アクチビンA、 EGFはペプロテック社（ニュージャージー州ロッキーヒル、米国）より、アクターゼはエムエステクノシステムズ社（大阪）より、DMSO、 PD98059、 5-アザ-2'-デオキシシチジン、A-83-01、 Y-27632、 Hoechst33342は和光純薬工業社（大阪）より、マウスモノクローナル抗ヒトvillin 1 抗体 および抗ヒトBCRP/ABCG2 抗体はアブカム社（ケンブリッジ、英国）より、抗ヒトNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase抗体はGeneTex.（マサチューセッツ州ウーバン、米国）、抗ヒトPEPT1抗体 はSanta Cruz Biotechnology, Inc（テキサス州ダラス、米国）より、[<sup>14</sup>C]アンチピリン はAmerican Radiolabeled Chemicals, Inc.（ミズーリ州セントルイス、米国）より、[<sup>3</sup>H]アテノロール、 [<sup>3</sup>H]メトプロロール、 および[<sup>3</sup>H] グリシルサルコシンはMoravek Biochemicals, Inc.（カリフォルニア州ブレア、米国）より、 (-)-[メトキシ-<sup>3</sup>H]スルピリドおよび [<sup>14</sup>C]ポリエチレングリコール（PEG）4000 はPerkinElmer, Inc.（マサチューセッツ州ボストン、米国）より、霊長類ES/iPS 細胞用細胞剥離液はリプロセル社（東京）より購入して用いた。その他の試薬は全て市販の高速液体クロマトグラフ用もしくは特級品を用いた。

### 3.2.2 ヒトiPS細胞の培養

ヒトiPS細胞 (Windy) は、2.2.2 で述べたように国立成育医療研究センター研究所の梅澤明弘博士らにより、ご供与いただいた。未分化のヒトiPS細胞の維持培養はMEF上で行い、

2.2.2 で述べた方法と同様に行った。

### 3.2.3 ヒト iPS 細胞の腸細胞への分化

ヒト iPS 細胞から腸細胞への分化は 2.2.3 で述べた方法と同様に行った。簡単に述べると、ヒト iPS 細胞を 100 ng/mL アクチビン A によって 72 時間処理することによって内胚葉へ分化させた。次に内胚葉様細胞に 250 ng/mL FGF2 を 96 時間処理することによって小腸幹細胞へと分化させた。最後に、Matrigel にてコーティングした 24 ウェルプレートまたはセルカルチャーインサート上に継代し、20 ng/mL EGF を含む培地で培養した。その後、20  $\mu$ M PD98059、5  $\mu$ M 5-アザ-2'-デオキシシチジン、および 0.5  $\mu$ M A-83-01 を分化開始 14 日目から添加し、さらに培養を続けた。本章においては第 2 章の検討で最も分化成熟度の高かった PD98059、5-アザ-2'-デオキシシチジンおよび A-83-01 の組み合わせを用いることにした。培地は 3 日おきに交換した。薬物の膜透過を行う前に Millicell ERS-2 (Millipore、マサチューセッツ州ベドフォード、米国) を用いて TEER 値を測定し、細胞層の形成を確認した。

### 3.2.4 取り込み試験

培地を除去し、分化した細胞をトランスポートバッファー (10 mM MES を含むハンス平衡塩溶液 pH 6.0) で 37°C、15 分間プレインキュベーションした。プレインキュベーション終了後、135 nM [<sup>3</sup>H]グリシルサルコシンを含んだトランスポートバッファーに交換することで取り込みを開始させた。必要に応じて PEPT1 の阻害剤である 3 mM イブuproフェン (Omkvist et al., 2010) 存在下または 4°C の条件下で取り込み試験を行った。所定の時間経過後、氷冷したトランスポートバッファーを加えることによって反応を止め、さらに氷冷したトランスポートバッファーで 2 回洗浄した。その後、0.5% のドデシル硫酸ナトリウムを含む 0.2 M の水酸化ナトリウム溶液 (0.5 mL) で細胞を可溶化した。この測定サンプルに 3 mL の Clear-sol I (ナカライテスク、京都) および 0.1 M 塩酸を加えて攪拌した後、液体シンチレーションカウンタ (日立アロカメディカル、東京) を用いて放射能を測定した。グリシルサルコシンの取り込み活性は Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.、マサチューセッツ州ウォルサム、米国) を用いてタンパク定量を行うことにより補正した。

### 3.2.5 免疫蛍光染色

分化した細胞を 1 mM 塩化カルシウムおよび 1 mM 塩化マグネシウムを含む PBS で 2 回洗浄した。次に -20°C に冷却したメタノールを加え、4°C、5 分で固定と膜透過処理を行った。PBS



で3回洗浄し、2%スキムミルクを含むPBSを用いて室温、20分間ブロッキングした。そして、抗ヒトvillin 1抗体および抗ヒトNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase抗体を希釈倍率 (1:100) でPBSに希釈し、室温、60分間反応させた。PBSで細胞を3回洗浄し、希釈倍率 (1:500) のAlexa Fluor 488-および 568-でラベルされた2次抗体を含むPBSで室温、60分処理した。さらにPBSで3回洗浄し1 μg/mL 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) を含むPBSで室温、5分間反応させ、PBSで1回洗浄した。最後に細胞をグリセロールとPBS (マグネシウム、カルシウムを含まないものを使用した) 9:1で混合した封入剤を用いてスライドガラスの上にマウントした。細胞の観察はLSM 510Meta confocal microscope (Carl Zeiss Inc., オーバーコッペン、ドイツ) を用いて行った。

### 3.2.6 TEER値の測定

セルカルチャーインサート上に培養したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞様細胞層のTEER値の測定はMillicell ERS-2 (Millipore、マサチューセッツ州ベドフォード、米国)を用いて測定した。

### 3.2.7 膜透過試験

Apicalおよびbasal側の培地を除去し、トランスポートバッファー (10 mM HEPES を含むハンクス平衡塩溶液、pH 7.4) を加え、37°C で15分間プレインキュベーションした。プレインキュベーション後、apical側を1.15 μM [<sup>14</sup>C]アンチピリン、87.1 nM [<sup>3</sup>H]アテノロール、9.39 nM [<sup>3</sup>H]メトプロロール、7.70 nM [<sup>3</sup>H]スルピリドまたは 1.31 nM [<sup>14</sup>C]PEG4000を含むトランスポートバッファーに交換することで膜透過試験を開始した。30、60および 120分経過後、basal側の溶液を一部採取し、これを測定用サンプルとした。採取後は同量のトランスポートバッファーをbasal側に加えた。この測定サンプルに3 mLのClear-sol I (ナカライテスク、京都) および0.1 M塩酸を加えて攪拌した後、液体シンチレーションカウンター (日立アロカメディカル、東京)を用いて放射能を測定した。Hoechst33342の膜透過試験も上記と同様にプレインキュベーションを行った。プレインキュベーション後、20 μM Hoechst33342 を含むトランスポートバッファーをapical側もしくはbasal側に加えることで膜透過試験を開始した。必要に応じて、10 μM Ko143を添加した。37°C、120分間でインキュベートした後、basalもしくはapical側から測定用サンプルを採取した。測定用サンプルのHoeschst33342の蛍光強度は蛍光プレートリーダー (ARVO MX 1420 Multilabel Counter、Perkin Elmer Inc., マサチューセッツ州ウォルサム、米国) を用い、励起波長は355 nm、蛍光波長は460 nmで測定を行った。

### 3.2.8 見かけの膜透過係数の算出

輸送試験の見かけの膜透過係数 ( $P_{app}$ ) は次のように計算された。:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \times C_0}$$

$dQ/dt$  は単位時間あたりに透過された薬物総量、 $A$  はセルカルチャーインサート膜の表面積 ( $0.3 \text{ cm}^2$ )、 $C_0$  はドナーチャンバーに添加した基質の初濃度を示す。Hoechst33342 の流出比率 (ER) は basal 側から apical 側への  $P_{app}$  を apical 側から basal 側への  $P_{app}$  で除すことによって算出した。

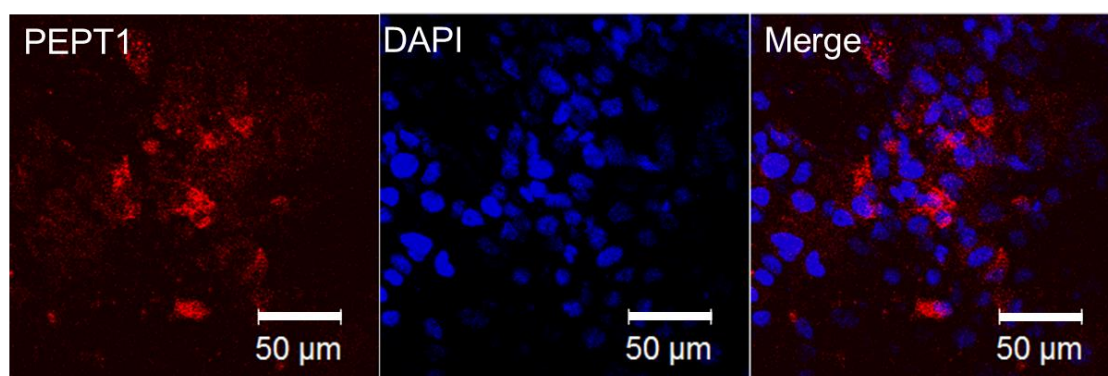
### 3.2.9 統計解析

PEPT1 を介した輸送解析における統計的有意性のレベルは、スチューデント  $t$  検定を用いて評価した。多重比較は、分散分析を行った後、ダネット法を用いた。その際の統計分析は、PASW Statistict 18 system software を用いて行った (IBM、ニューヨーク州アモンク、米国)。5 つのテスト化合物の  $P_{app}$  値とヒト消化管における吸収率 ( $F_a$ ) との間の相関関係を  $p$  値と相関係数 ( $R$  値) を算出することにより求めた。 $p$  値、 $R$  値およびシグモイドカーブの算出は PASW Statistict 18 system software を用いて行った (IBM、ニューヨーク州アモンク、米国)。

### 3.3 結果

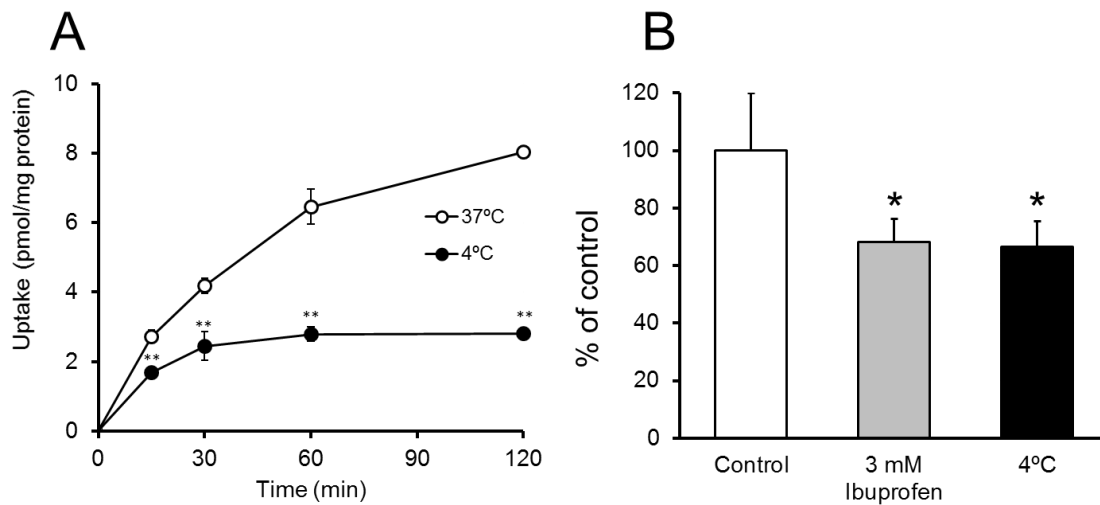
#### 3.3.1 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞における PEPT1 を介した輸送解析

小腸に発現しているペプチドトランスポーターである PEPT1 は、管腔からのペプチドの取り込みに重要な役割をはたしている(Liang et al., 1995; Giacomini et al., 2010)。そこで、まず PEPT1 の機能について評価を行うことにした。はじめに、分化させた腸管上皮細胞について免疫蛍光学的染色を行ったところ、タンパクレベルでの PEPT1 の発現が認められた (Fig. 6)。



**Fig. 6. Immunofluorescence staining analysis of PEPT1 in the differentiated enterocyte-like cells**  
After differentiation, the cells were stained with PEPT1 (red), and DAPI (blue). Scale bar: 50 μm.

次に、PEPT1 の基質として知られているグリシルサルコシン (Nakanishi et al., 1997)の取り込み試験を行った。37°C の条件下では時間依存的なグリシルサルコシンの取り込みが認められた (Fig. 7A)。一方、4°C 条件下で同様の試験を行うと、グリシルサルコシンの取り込み量は 30 分を経過したところでプラトーに達し、全てのサンプリングポイントにおいて 37°C 条件下と比較して有意な取り込み量の低下が認められた。さらに、PEPT1 特異的な輸送であるかを確かめるために、PEPT1 の阻害剤であるイブuproフェンを用いて取り込み試験を行った。その結果、イブuproフェン存在下におけるグリシルサルコシンの細胞内取り込みは 4°C 条件下と同程度にまで減少することが確認された (Fig. 7B)。



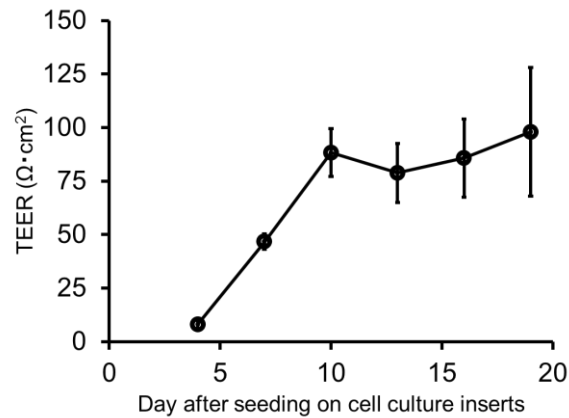
**Fig. 7. Uptake of glycylsarcosine in the differentiated enterocyte-like cells**

Following differentiation, the enterocyte-like cells were incubated with a transport buffer (pH 6.0) containing glycylsarcosine at 37°C, with or without 3 mM ibuprofen, or at 4°C. Data are represented as the mean  $\pm$  S.D. (A:  $n = 3$ , B:  $n = 4$ ). Open and closed symbols bars show the uptake at 37°C and 4°C, respectively, and the gray bar shows the uptake with 3 mM ibuprofen at 37°C. Levels of statistical significance compared with the uptake at 37°C: A: \*\* $P < 0.01$ ; B: \* $P < 0.05$ .

### 3.3.2 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞層の形態学的特性解析

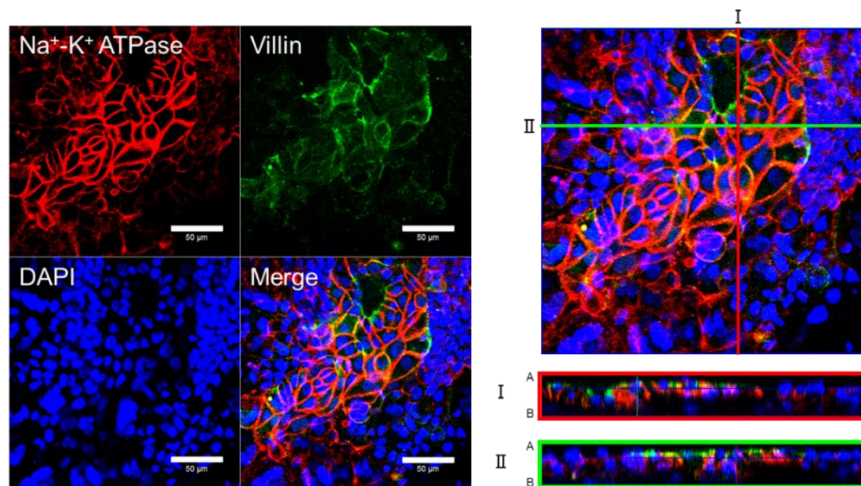
P-gp と同様に重要な排出トランスポーターのひとつである BCRP の機能評価を行った。この評価を行うにあたっては、分化した腸管上皮細胞が極性を持った細胞層を形成している必要がある。そこで、分化開始 7 日目でセルカルチャーインサート上に播種後 14 日間培養し、分化させた腸管上皮細胞様細胞が細胞層を形成するか、また極性を有しているかについて解析を行った。

セルカルチャーインサート上に細胞を播種後、TEER 値は時間依存的に上昇し、播種後 10 日目以降およそ  $100 \Omega \times \text{cm}^2$  でプラトーに達した (Fig. 8)。また、分化終了後に免疫蛍光染色を行い、腸管上皮マーカーである villin は apical 側に、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase は basal 側に発現していることが確認された (Fig. 9)。



**Fig. 8. Time-dependent changes of TEER values in the enterocyte-like cell layer**

The enterocyte-like cells were seeded on Matrigel-coated cell culture inserts. TEER values were measured every three days from day 4 after seeding. Data were represented as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 22$ ).



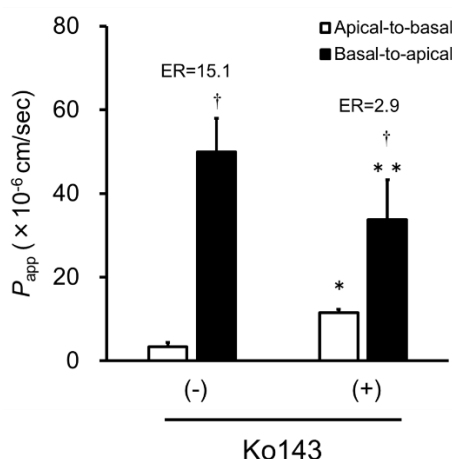
**Fig. 9. Immunofluorescence staining analysis of villin and  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase in the differentiated enterocyte-like cells**

The enterocyte-like cells were seeded on Matrigel-coated cell culture inserts. After differentiation, the cells were stained with villin (green),  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase (red), and DAPI (blue). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . I and II are cross-sectional views along the red and green lines, respectively. A: apical side; B: basal side.

これらの結果より、分化した腸管上皮細胞層はタイトジャンクションを形成し、極性も有していることが示唆され、排出トランスポーターの評価に用いることが可能であると考えられた。

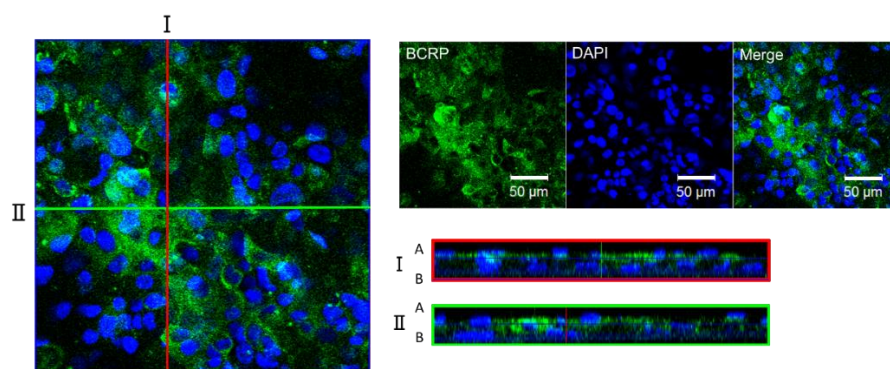
### 3.3.3 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞における BCRP を介した輸送解析

排出トランスポーターである BCRP は小腸の上皮細胞の apical 側に高発現していることが知られている。さらに小腸での基質薬物の吸収においては薬物間相互作用の観点からも重要である(Giacomini et al., 2010)。そこで、次に BCRP の機能解析および BCRP の細胞層での局在について評価することにした。まず、セルカルチャーインサート上に培養したヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞層を用いて、BCRP の基質である Hoechst33342 (Doyle and Ross, 2003) の双方向性輸送試験を行った。その結果、apical 側から basal 側への  $P_{app}$  は  $3.3 \pm 1.1 \times 10^{-6}$  cm/sec、basal 側から apical 側への  $P_{app}$  は  $50.0 \pm 8.0 \times 10^{-6}$  cm/sec と算出された (Fig. 10)。これより算出した ER は 15.1 となり、排出方向優位な輸送が認められた。また、BCRP の阻害剤である Ko143 (Allen et al., 2002) 存在下で同様の試験を行うと、apical 側から basal 側への  $P_{app}$  は  $11.5 \pm 0.8 \times 10^{-6}$  cm/sec に増加し、basal 側から apical 側への  $P_{app}$  は  $33.7 \pm 9.6 \times 10^{-6}$  cm/sec に減少した。これより算出した ER は 2.9 に低下した。さらに、免疫蛍光学的染色により、BCRP は apical 側に局在することも認められた (Fig. 11)。



**Fig. 10. Bidirectional permeability of Hoechst33342 across in the enterocyte-like cell layer**

The enterocyte-like cells were seeded on Matrigel-coated cell culture inserts. After differentiation, the cells were incubated with the transport buffer (pH 7.4) containing Hoechst33342 (20  $\mu$ M) for 120 min at 37°C in the presence or absence of Ko143 (10  $\mu$ M). Data are represented as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ). White or black bars show apical-to-basal or basal-to-apical  $P_{app}$  values, respectively. ER of Hoechst33342 was calculated by dividing  $P_{app}$  of the basal-to-apical transport by that of the apical-to-basal transport. Levels of statistical significance compared with the each  $P_{app}$  value in the absence of Ko143: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; and compared with each  $P_{app}$  values for apical-to-basal transport: † $P < 0.01$ .



**Fig. 11. Immunofluorescence staining analysis of BCRP in the differentiated enterocyte-like cells**  
The enterocyte-like cells were seeded on Matrigel-coated cell culture inserts. After differentiation, the cells were stained with BCRP (green) and DAPI (blue) . Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . I and II are cross-sectional views along the red and green lines, respectively. A: apical side; B: basal side.

### 3.3.4 腸管上皮様細胞層での横断的な試験化合物透過試験

次に、ヒト消化管における薬物の  $F_a$  を予測可能かどうか評価するために、ヒトにおいて異なる  $F_a$  (1–97%) を示す 5 つの試験化合物を用いて膜透過試験を行った。5 つの試験化合物の  $P_{\text{app}}$  は 2.04 から  $9.99 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$  と算出され、

**Table 3.  $P_{\text{app}}$  of test compounds in enterocyte-like cell layer**

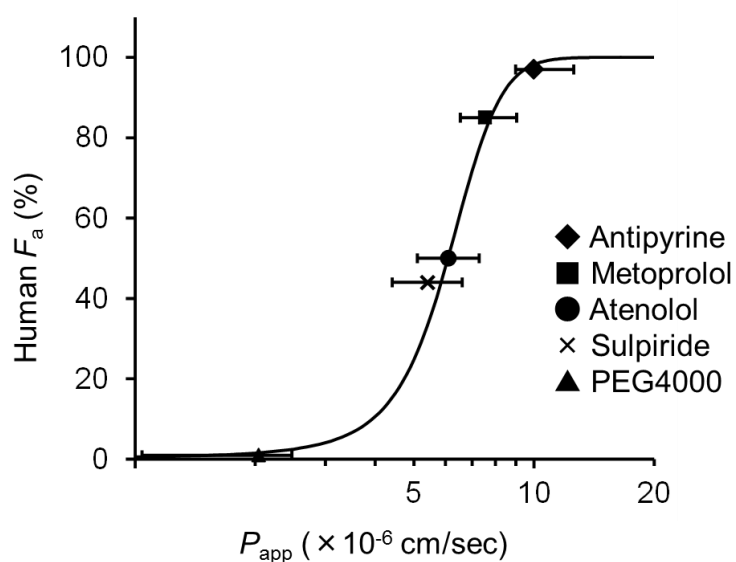
Compounds	$P_{\text{app}}$ ( $\times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ )			$F_a$ (%) <sup>a</sup>	$P_{\text{app}}$ ( $10^{-6} \text{ cm/sec}$ ) <sup>a</sup> (Ussing chamber)
	Mean	$\pm$	S.D.		
Antipyrine	9.99	$\pm$	2.59	97	$26.8 \pm 2.81$
Metoprolol	7.54	$\pm$	1.51	85	$12.2 \pm 2.70$
Atenolol	6.10	$\pm$	1.19	50	$2.82 \pm 0.65$
Sulpiride	5.41	$\pm$	2.74	44	$3.96 \pm 1.35$
PEG4000	2.04	$\pm$	0.43	1 (<1)	$0.88 \pm 0.66$

$P_{\text{app}}$  values were represented as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ).

<sup>a</sup> $F_a$  and  $P_{\text{app}}$  values were obtained from published data (Rozeňnal V et al., 2012)

$P_{\text{app}}$  の大小関係はこれら試験化合物の  $F_a$  の大小関係と一致した (Table 3)。また、算出された  $P_{\text{app}}$  と  $F_a$  の間には良好な相関関係認められた。それぞれのパラメーターとしてプロット

すると分化した腸管上皮細胞様細胞層において 5 化合物の  $P_{app}$  と  $F_a$  の間で Fig. 12 に示すようなシグモイドの関係が認められた ( $F_a=1 / (0.01 + 5.28 * 0.36^{P_{app}})$ 、 $P < 0.01$ 、 $R = 0.99$ 、Fig. 12)。



**Fig. 12. Relationship between  $F_a$  values and  $P_{app}$  of test compounds across the enterocyte-like cell layer**

The enterocyte-like cells were seeded on Matrigel-coated cell culture inserts. Following differentiation, the cells were incubated with the transport buffer (pH 7.4) containing antipyrine, atenolol, metoprolol, sulpiride, or PEG4000 for 120 min at 37°C. The correlation curve was fitted by using the following formula:  $F_a=1 / (0.01 + 5.28 * 0.36^{P_{app}})$ . Data were represented as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ).  $P < 0.01$ ;  $R = 0.99$ .



### 3.4 考察

ペプチドトランスポーターである PEPT1 は小腸内腔において主に食事のジペプチドやトリペプチドの吸収を行う。また、化学構造中にペプチド結合を含む  $\beta$  ラクタム系抗生物質やバラシクロビルのようにペプチド結合が導入されるように設計されたプロドラッグの吸収においても PEPT1 は関与している。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞においてジペプチドに類似した構造をもつグリシルサルコシンの PEPT1 を介した取り込み活性を評価した。その結果、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は PEPT1 を介した輸送を定量的に解析可能であった (Fig. 7)。これまでの報告では PEPT1 を介した取り込み能の評価は蛍光ラベル標識されたジペプチドもしくはトリペプチドを用いて行われるような定性的なものに留まっていた (Iwao et al., 2014; Ozawa et al., 2015)。従って、この結果は、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞が PEPT1 のような取り込みトランスポーターの機能を定量的に評価可能なモデル系として利用できる可能性を示す新しい知見である。

ヒト消化管における薬物の吸収率の予測や排出トランスポーターの機能評価のためには細胞をセルカルチャーインサート上に播種し、タイトジャンクションを有する細胞層を形成させる必要がある。また、その細胞層は生体内と同様に極性を有していることも必要である。そこで次に、ヒト iPS 細胞由来細胞層の形態学的な特性解析、および薬物の膜透過試験を行った。セルカルチャーインサート上に培養したヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞層の TEER 値は徐々に増大し、最終的にはおよそ  $100 \Omega \times \text{cm}^2$  でプラトーに達した (Fig. 8)。ヒト小腸の TEER 値はおよそ  $40 \Omega \times \text{cm}^2$  であることが報告されている (Sjoberg et al., 2013)。また、ヒト小腸上皮細胞 (HIEC) 単層膜の TEER 値は  $98.9 \Omega \times \text{cm}^2$  であり、Caco-2 細胞単層膜の TEER 値 ( $900 \Omega \times \text{cm}^2$ ) よりも低かったという報告もある (Takenaka et al., 2014)。これらの報告を踏まえると、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞層の TEER 値は、Caco-2 細胞単層膜よりも HIEC 単層膜やヒト小腸組織のものに近いと考えられる。さらに、免疫蛍光染色によりヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞層では villin および BCRP が apical 側に、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase が basal 側に発現していることも確認された (Fig. 9 および 11)。これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞層は小腸に類似したルーズなタイトジャンクションを形成し、極性も有していることが示唆された。

小腸の apical 側には複数の排出トランスポーターが発現している。その中でも P-gp および BCRP の発現量は非常に高く、経口投与される薬物の吸収を制御している (Englund et al., 2006; Takano et al., 2006; Maubon et al., 2007; Shirasaka et al., 2008; Giacomini et al., 2010)。そのため、薬物相互作用に関する FDA のガイダンス (FDA (2012) Guidance for industry Drug interaction studies —study design, data analysis, implications for dosing, and labeling

recommendations. DRAFT GUIDANCE. ) や MHLW のガイドライン (最終案) (厚生労働省医薬食品局(2014)医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (最終案)) では、医薬品候補化合物が、これらの基質になるかどうか評価すべきであると示されている。本研究で作製したヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は BCRP を介した排出方向優位な輸送能を有しており、その輸送は阻害剤である Ko143 により阻害された (Fig. 10) 。このことから、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は取り込みトランスポーターに加え、排出トランスポーターの機能評価にも利用可能であることが示唆された。

一方、結果には示していないが小腸上皮細胞の主要な排泄トランスポーターである P-gp に対する機能性評価としてジゴキシシンとベラパミルを用いた双方向性輸送試験を行ったが輸送能は認められなかった。このことはおそらく分化した細胞の P-gp の mRNA の発現レベルがヒト成人小腸の 0.7%程度と低かったことから、タンパク質としての機能評価も出来なかったものと思われる。

さらに  $F_a$  が異なる (1-97%) 化合物の膜透過性試験から得られた  $P_{app}$  と  $F_a$  との間には良好な相関関係が認められた (Fig. 12) 。トランスポーターや薬物代謝酵素の基質になる薬物も含めて、より多くの化合物を用いた評価が必要であると思われるが、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いてヒト消化管の  $F_a$  を予測できる可能性を本研究では示すことができたと考える。

### 3.5 小括

本章ではヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞層が小腸に類似したルーズなタイトジャンクションを持つ細胞層を形成し、極性を有することが明らかとなった。また、取り込みトランスポーターである PEPT1 および排出トランスポーターである BCRP を介した定量的な評価も可能であることが示された。さらにより多くの化合物を用いた評価の必要性という課題も残ったが、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞層における  $P_{app}$  から、ヒト消化管における  $F_a$  を予測できる可能性が示唆された。

## 第四章 総括

本研究では、以下の知見を得る事ができた。

MAP 経路、DNMT および TGF- $\beta$  経路の阻害は、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化促進および薬物動態学的機能獲得に有用であることが明らかとなった。この方法により分化させた腸管上皮細胞は、各種薬物代謝酵素活性、VDR を介した CYP3A4 誘導能、取り込みおよび排出トランスポーターを介した輸送能を有していた。また、膜透過試験により得られた  $P_{app}$  と  $F_a$  の間には良好な相関が認められ、ヒト消化管における  $F_a$  が予測できる可能性が示唆された。さらに、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞はヒト小腸に類似したルーズなタイトジャンクションと極性を持った細胞層を形成することも明らかとなった。一方、本研究で作製したヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は、P-gp を介した輸送活性や RIF による CYP3A4 の誘導など機能的に不十分であった。また、ヒト小腸のモデル系として用いるためには、その他の薬物トランスポーター (OCT、OATP および Na/アミノ酸輸送系など) の機能解析、電子顕微鏡下による形態学的解析などもより詳細に特徴解析が必要であると考ええる。

今回、ヒトにおいて吸収率の異なる 5 つの試験化合物を用いて膜透過試験を行い 5 つの試験化合物の  $P_{app}$  の大小関係と  $F_a$  の大小関係が一致する結果が得られたものの、化合物同士の  $P_{app}$  の値を比較すると大きな差は認められなかった (Table 3 と Fig. 12)。メトプロロールやアテノロールなどの  $F_a$  が中程度の薬物については薬物トランスポーターの寄与も報告されており、本検討により作製したヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の OCT2 や OATP1A2 の発現レベルにより  $P_{app}$  が変動する可能性も考えられた (Bachmakov et al., 2009; Bailey, 2010; Krajcsi, 2013)。より最適な分化培養条件の検討や、シクロスポリンやロスバスタチンおよびサキナビルなどの薬物トランスポーターや薬物代謝酵素の両基質となる薬物や臨床においてヒト小腸における薬物間相互作用が問題となっている薬物、グレープフルーツなどの食品との相互作用も含めたより多くの化合物を用いて  $P_{app}$ - $F_a$  相関解析を行う必要などの課題も明らかとなった。しかしながら、今後さらに改良を行うことでヒト iPS 細胞由来腸管上皮

細胞はヒト消化管における薬物の吸収および代謝を同時に評価可能な新規モデル系として、非常に有用な材料となり得ることが示唆された。

## 謝 辞

本研究の遂行に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 松永民秀 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に際し、格別の御配慮と御激励を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 鈴木 匡 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 岩尾岳洋 准教授に深甚なる謝意を表します。

本論文作成にあたり、種々の有益な御助言と御校閲を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科病態解析学分野 青山峰芳 教授、名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物動態制御学分野 湯浅博昭 教授ならびに名古屋市立大学大学院薬学研究科医薬品安全性評価学分野 頭金正博 教授に深謝いたします。

本研究の遂行に際し、有益な御助言とご協力を賜りました琉球大学医学部附属病院薬剤部 中村克徳教授（前 名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 准教授）ならびに名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 菊池千草 講師に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ヒトiPS 細胞をご供与頂きました国立成育医療研究センター研究所 阿久津英憲 博士、宮川世志幸 博士、大喜多肇 博士、清河信敬 博士、豊田雅士 博士ならびに梅澤明弘 博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、トランスポーター機能解析について御指導くださいました金城学院大学薬学部薬学科 太田欣哉 准教授（前 名古屋市立大学 大学院薬学研究科薬物動態制御学分野 助教）ならびに独立行政法人労働者健康安全機構中部労災病院薬剤部 片野貴大 博士（前 名古屋市立大学 大学院薬学研究科薬物動態制御学分野 研究員）に謹んで御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、代謝物の測定を行っていただきました田辺三菱製薬株式会社  
育薬本部 育薬管理部 堀川隆司 博士（前 田辺三菱製薬株式会社研究本部 薬物動態研  
究所）ならびにノーベルファーマ株式会社 研究開発本部 非臨床研究開発部 丹羽 卓朗  
氏（前 田辺三菱製薬株式会社 薬物動態研究所）に謹んで御礼申し上げます。

最後に、研究途上種々の御便宜を図っていただきました名古屋市立大学大学院薬学研究科  
臨床薬学分野ならびに薬学部臨床薬学教育研究センターの卒業生、在室生ならびに研究員  
に感謝致します。

## 引用文献

- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, and Saltiel AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **270**:27489-27494.
- Allen JD, van Loevezijn A, Lakhai JM, van der Valk M, van Tellingen O, Reid G, Schellens JH, Koomen GJ, and Schinkel AH (2002) Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* **1**:417-425.
- Bachmakov I, Glaeser H, Endress B, Morl F, Konig J, and Fromm MF (2009) Interaction of beta-blockers with the renal uptake transporter OCT2. *Diabetes Obes Metab* **11**:1080-1083.
- Bailey DG (2010) Fruit juice inhibition of uptake transport: a new type of food-drug interaction. *Br J Clin Pharmacol* **70**:645-655.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, and Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* **449**:1003-1007.
- Brand W, Boersma MG, Bik H, Hoek-van den Hil EF, Vervoort J, Barron D, Meinel W, Glatt H, Williamson G, van Bladeren PJ, and Rietjens IM (2010) Phase II metabolism of hesperetin by individual UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases and rat and human tissue samples. *Drug Metab Dispos* **38**:617-625.
- Chen WP, Liu YH, Ho YJ, and Wu SM (2015) Pharmacological inhibition of TGFβ receptor improves Nkx2.5 cardiomyoblast-mediated regeneration. *Cardiovasc Res* **105**:44-54.
- Choi JS, Choi I, and Choi DH (2013) Effects of nifedipine on the pharmacokinetics of repaglinide in rats: possible role of CYP3A4 and P-glycoprotein inhibition by nifedipine. *Pharmacol Rep* **65**:1422-1430.
- Cubitt HE, Houston JB, and Galetin A (2009) Relative importance of intestinal and hepatic glucuronidation-impact on the prediction of drug clearance. *Pharm Res* **26**:1073-1083.
- Dessimoz J, Opoka R, Kordich JJ, Grapin-Botton A, and Wells JM (2006) FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo. *Mech Dev* **123**:42-55.
- Doyle L and Ross DD (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* **22**:7340-7358.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, and Saltiel AR (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7686-



7689.

- Englund G, Rorsman F, Ronnblom A, Karlbom U, Lazorova L, Grasjo J, Kindmark A, and Artursson P (2006) Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* **29**:269-277.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, and Trzaskos JM (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* **273**:18623-18632.
- Fukuda K and Kikuchi Y (2005) Endoderm development in vertebrates: fate mapping, induction and regional specification. *Dev Growth Differ* **47**:343-355.
- Galetin A and Houston JB (2006) Intestinal and hepatic metabolic activity of five cytochrome P450 enzymes: impact on prediction of first-pass metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* **318**:1220-1229.
- Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, and Zhang L (2010) Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **9**:215-236.
- Grapin-Botton A and Melton DA (2000) Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet* **16**:124-130.
- Grossmann J, Maxson JM, Whitacre CM, Orosz DE, Berger NA, Fiocchi C, and Levine AD (1998) New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* **153**:53-62.
- Gu N, Adachi T, Matsunaga T, Tsujimoto G, Ishihara A, Yasuda K, and Tsuda K (2007) HNF-1alpha participates in glucose regulation of sucrase-isomaltase gene expression in epithelial intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **353**:617-622.
- Gurung S, Werkmeister JA, and Gargett CE (2015) Inhibition of Transforming Growth Factor-beta Receptor signaling promotes culture expansion of undifferentiated human Endometrial Mesenchymal Stem/stromal Cells. *Sci Rep* **5**:15042.
- Habano W, Gamo T, Terashima J, Sugai T, Otsuka K, Wakabayashi G, and Ozawa S (2011) Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells. *BMC Cancer* **11**:81.
- Harwood MD, Achour B, Neuhoﬀ S, Russell MR, Carlson G, Warhurst G, and Rostami-Hodjegan A (2015) In Vitro-In Vivo Extrapolation Scaling Factors for Intestinal P-

- glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein: Part I: A Cross- Laboratory Comparison of Transporter Protein Abundances and Relative Expression Factors in Human Intestine and Caco-2 Cells. *Drug Metab Dispos.*
- Herbst RS (2004) Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59**:21-26.
- Huang K and Fan G (2010) DNA methylation in cell differentiation and reprogramming: an emerging systematic view. *Regen Med* **5**:531-544.
- Imaizumi Y and Okano H (2014) Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells. *J Neurochem* **129**:388-399.
- Iwao T, Kodama N, Kondo Y, Kabeya T, Nakamura K, Horikawa T, Niwa T, Kurose K, and Matsunaga T (2015) Generation of enterocyte-like cells with pharmacokinetic functions from human induced pluripotent stem cells using small-molecule compounds. *Drug Metab Dispos* **43**:603-610.
- Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, and Matsunaga T (2014) Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method. *Drug Metab Pharmacokinet* **29**:44-51.
- Jha R, Xu RH, and Xu C (2015) Efficient differentiation of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells with growth factors. *Methods Mol Biol* **1299**:115-131.
- Jin B, Li Y, and Robertson KD (2011) DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer* **2**:607-617.
- Kauffman AL, Gyurdieva AV, Mabus JR, Ferguson C, Yan Z, and Hornby PJ (2013) Alternative functional in vitro models of human intestinal epithelia. *Front Pharmacol* **4**:79.
- Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Nagata K, Kurose K, Saito M, Niwa T, Suzuki T, Miyata N, Ohmori S, Nakamura K, and Matsunaga T (2014) Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One* **9**:e104010.
- Kong D, Li Y, Wang Z, and Sarkar FH (2011) Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers (Basel)* **3**:716-729.
- Kostewicz ES, Abrahamsson B, Brewster M, Brouwers J, Butler J, Carlert S, Dickinson PA, Dressman J, Holm R, Klein S, Mann J, McAllister M, Minekus M, Muenster U, Mullertz A, Verwei M, Vertzoni M, Weitschies W, and Augustijns P (2014) In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci* **57**:342-366.

- Krajcsi P (2013) Drug-transporter interaction testing in drug discovery and development. *World Journal of Pharmacology* **2**:35.
- Laprise P, Langlois MJ, Boucher MJ, Jobin C, and Rivard N (2004) Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* **199**:32-39.
- Le Ferrec E, Chesne C, Artusson P, Brayden D, Fabre G, Gires P, Guillou F, Rousset M, Rubas W, and Scarino ML (2001) In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern Lab Anim* **29**:649-668.
- Lemieux E, Boucher MJ, Mongrain S, Boudreau F, Asselin C, and Rivard N (2011) Constitutive activation of the MEK/ERK pathway inhibits intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**:G719-730.
- Li H, Jin HE, Shim WS, and Shim CK (2013) An improved prediction of the human in vivo intestinal permeability and BCS class of drugs using the in vitro permeability ratio obtained for rat intestine using an Ussing chamber system. *Drug Dev Ind Pharm* **39**:1515-1522.
- Liang R, Fei YJ, Prasad PD, Ramamoorthy S, Han H, Yang-Feng TL, Hediger MA, Ganapathy V, and Leibach FH (1995) Human intestinal H<sup>+</sup>/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* **270**:6456-6463.
- Maubon N, Le Vee M, Fossati L, Audry M, Le Ferrec E, Bolze S, and Fardel O (2007) Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundam Clin Pharmacol* **21**:659-663.
- McLin VA, Rankin SA, and Zorn AM (2007) Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* **134**:2207-2217.
- Moore LD, Le T, and Fan G (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* **38**:23-38.
- Nakamura T, Sakaeda T, Ohmoto N, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Kamigaki T, Nakamura T, Kim KI, Kim SR, Kuroda Y, Matsuo M, Kasuga M, and Okumura K (2002) Real-time quantitative polymerase chain reaction for MDR1, MRP1, MRP2, and CYP3A-mRNA levels in Caco-2 cell lines, human duodenal enterocytes, normal colorectal tissues, and colorectal adenocarcinomas. *Drug Metab Dispos* **30**:4-6.
- Nakanishi T, Tamai I, Sai Y, Sasaki T, and Tsuji A (1997) Carrier-mediated transport of oligopeptides in the human fibrosarcoma cell line HT1080. *Cancer Res* **57**:4118-4122.

- Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, and Kitano H (2005) A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* **1**:2005.0010.
- Ogaki S, Shiraki N, Kume K, and Kume S (2013) Wnt and Notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages. *Stem Cells* **31**:1086-1096.
- Ohno S and Nakajin S (2009) Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos* **37**:32-40.
- Okano M, Xie S, and Li E (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* **19**:219-220.
- Omkvist DH, Brodin B, and Nielsen CU (2010) Ibuprofen is a non-competitive inhibitor of the peptide transporter hPEPT1 (SLC15A1): possible interactions between hPEPT1 substrates and ibuprofen. *Br J Pharmacol* **161**:1793-1805.
- Ozawa T, Takayama K, Okamoto R, Negoro R, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, and Mizuguchi H (2015) Generation of enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells for drug absorption and metabolism studies in human small intestine. *Sci Rep* **5**:16479.
- Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, and Zeldin DC (2006) The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos* **34**:880-886.
- Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD, and Thummel KE (1997) Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* **283**:1552-1562.
- Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, and ten Dijke P (1999) TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* **112** ( Pt 24):4557-4568.
- Sanders EJ (1988) The roles of epithelial-mesenchymal cell interactions in developmental processes. *Biochem Cell Biol* **66**:530-540.
- Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, and Clevers H (2011) Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* **141**:1762-1772.
- Schmiedlin-Ren P, Thummel KE, Fisher JM, Paine MF, and Watkins PB (2001) Induction of CYP3A4 by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 is human cell line-specific and is unlikely to involve pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* **29**:1446-1453.

- Sheaffer KL, Kim R, Aoki R, Elliott EN, Schug J, Burger L, Schubeler D, and Kaestner KH (2014) DNA methylation is required for the control of stem cell differentiation in the small intestine. *Genes Dev* **28**:652-664.
- Shirasaka Y, Sakane T, and Yamashita S (2008) Effect of P-glycoprotein expression levels on the concentration-dependent permeability of drugs to the cell membrane. *J Pharm Sci* **97**:553-565.
- Sjoberg A, Lutz M, Tannergren C, Wingolf C, Borde A, and Ungell AL (2013) Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *Eur J Pharm Sci* **48**:166-180.
- Smith MW (1985) Expression of digestive and absorptive function in differentiating enterocytes. *Annu Rev Physiol* **47**:247-260.
- Song N, Endo D, Song B, Shibata Y, and Koji T (2016) 5-aza-2'-deoxycytidine impairs mouse spermatogenesis at multiple stages through different usage of DNA methyltransferases. *Toxicology* **361-362**:62-72.
- Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, Hoskins EE, Kalinichenko VV, Wells SI, Zorn AM, Shroyer NF, and Wells JM (2011) Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* **470**:105-109.
- Sun D, Lennernas H, Welage LS, Barnett JL, Landowski CP, Foster D, Fleisher D, Lee KD, and Amidon GL (2002) Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs. *Pharm Res* **19**:1400-1416.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**:861-872.
- Takano M, Yumoto R, and Murakami T (2006) Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacol Ther* **109**:137-161.
- Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, Nagamoto Y, Harada K, Furukawa N, Ohtaka M, Nishimura K, Imagawa K, Sakurai F, Tachibana M, Sumazaki R, Noguchi E, Nakanishi M, Hirata K, Kawabata K, and Mizuguchi H (2014) Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:16772-16777.
- Takenaka T, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T, and Matsunaga T (2014) Human small intestinal epithelial cells differentiated from adult intestinal stem cells as a novel system for predicting oral drug absorption in humans. *Drug Metab Dispos* **42**:1947-

- 1954.
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**:442-454.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, and Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145-1147.
- Tojo M, Hamashima Y, Hanyu A, Kajimoto T, Saitoh M, Miyazono K, Node M, and Imamura T (2005) The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer Sci* **96**:791-800.
- Volpe DA (2008) Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *J Pharm Sci* **97**:712-725.
- Volpe DA (2011) Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future Med Chem* **3**:2063-2077.
- Wells JM and Melton DA (2000) Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* **127**:1563-1572.
- Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, and Zoghbi HY (2001) Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* **294**:2155-2158.
- Yoshida K, Maeda K, and Sugiyama Y (2013) Hepatic and intestinal drug transporters: prediction of pharmacokinetic effects caused by drug-drug interactions and genetic polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**:581-612.
- Zavadil J and Bottinger EP (2005) TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**:5764-5774.
- Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J, and Kaminsky LS (1999) Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* **27**:804-809.
- Zhou Q, Zheng Z, Xia B, Tang L, Lv C, Liu W, Liu Z, and Hu M (2010) Use of isoform-specific UGT metabolism to determine and describe rates and profiles of glucuronidation of wogonin and oroxylin A by human liver and intestinal microsomes. *Pharm Res* **27**:1568-1583.